Anwendung der Koppeschaarschen Methode auf Eiweiss- :: körper und ihre Spaltungsprodukte. ::

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
hohen philosophischen Fakultät der
Universität Leipzig

vorgelegt von

Heinrich Reppin
aus **Leipzig.**

ACAD.
LANDBAT.
BIBL.

Halle a. S.
Druck von Heinrich John.
1914.

Angenommen von der III. Sektion auf Grund der Gutachten der Herren

Paal und Hantzsch

Leipzig, den 19. Mai 1914.

Der Procancellar.
Kirchner.

Meinen Eltern.

Meinem hochverehrten Lehrer,

Herrn Professor Dr. M. Siegfried,

auf dessen Veranlassung ich vorliegende Arbeit ausführte, danke ich auch an dieser Stelle verbindlichst für die mir bei der Ausführung der Arbeit gewährte gütige Führung und Hilfe und das mir in reichstem Maße stets erwiesene Wohlwollen.

Inhaltsverzeichnis.

Seite

Einleitung 9
Aufgabe der Arbeit 11
Eigne Untersuchungen 12
I. Methodisches 13
1. Geringe Modifikation der Methode 16
2. Beeinflussung des Titers durch die zwischen Säurezusatz und Zurücktitrieren liegende Zeit 17
3. Beeinflussung des Titers durch die zwischen Jodkaliumzusatz und Zurücktitrieren liegende Zeit . . 18
4. Einfluß anwesenden Ammoniaks und von Ammonsalzen 19
5. Talkum als Hilfsmittel bei der Titration von Proteinkörpern 20
II. Untersuchung verschiedener Aminosäuren 22
1. Aufstellung des Quotienten $\frac{N}{Br}$ 24
2. Untersuchung von Aminosäuren ohne ringförmigen Komplex 25
a) Zeit der Bromierung $^1/_4$ Stunde mit Lüften des Stopfens bei Zusatz des Jodkaliums . . . . . Glykokoll, Alanin, α-Aminovaleriansäure, Leucin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Lysindichlorid, Arginindinitrat, Sarkosin, Betain, Asparagin . . 25
b) Ohne Lüften des Stöpsels bei Zusatz des Jodkaliums, Glykokoll, Alanin, Arginindinitrat . . 32

Seite

c) Zeit der Bromeinwirkung länger als $^1/_4$ Stunde. Glykokoll, Alanin, Alanin + Glykokoll, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin 32

3. Untersuchung von Aminosäuren mit ringförmigem Komplex 42

a) Zeit der Bromeinwirkung $^1/_4$ Stunde . . . . . Phenylalanin, Phenylglykokoll, Tyrosin, Tryptophan, Histidin 43

b) Zeit der Bromeinwirkung länger als $^1/_4$ Stunde. Tyrosin 52

4. Untersuchung von salzsaurem Glycylglycin, ein Peptid 53

III. Untersuchung von Eiweißkörpern und Eiweißspaltstücken 55

a) Bestimmung der Quotienten der Gelatine und ihrer unter verschiedenen Bedingungen erhaltenen Spaltungsprodukte 57

b) Bestimmung der Quotienten der unter verschiedenen Bedingungen erhaltenen Spaltungsprodukte von Kasein 66

c) Bestimmung der Quotienten verschiedener Peptone und ihrer unter verschiedenen Bedingungen erhaltenen Spaltungsprodukte, ferner von Edestin 69

IV. Methode der Tyrosinbestimmung von Brown und Millard 83

V. Die Ergebnisse der Untersuchungen . . . 87

Einleitung.

Das Vermögen der Eiweißkörper, Halogene umzusetzen, ist seit längerem Gegenstand eifrigen Studiums geworden.

Eine der ersten Arbeiten auf diesem Gebiet erschien 1875 von Böhm und Berg[1]) und enthält das Resultat, daß durch Einwirkung von Jod auf Eiweißlösung Bildung von Jodwasserstoff aber keine feste Bindung von Jod an das Eiweißmolekul eintritt.

Blum und Vaubel[2]) dagegen vertraten die Ansicht „im Widerspruch zu fast allen Autoren", daß bei Einwirkung von Cl, Br und J neben Halogenwasserstoffsäuren und ferner einer lockeren Anlagerung, endlich auch Halogensubstitution im Eiweißmolekul eintrete. Sie verweisen dabei auf Loew[3]) und Knop[4]) als die einzigen, die bis dahin bromhaltige Eiweißstoffe dargestellt hatten, und stellen Halogensubstitutionsprodukte des Eiweißes mit maximalem Halogengehalt dar, indem sie die entstehenden Halogenwasserstoffsäuren mit Natriumbikarbonat neutralisieren.

Besonders die Entdeckung des Jodgehaltes der Schilddrüse durch Baumann[5]) regte zum Studium der Halogeneiweißverbindungen und der Halogenaminosäuren an.

---

[1]) Arch. f. experiment. Path. u. Pharm. **5**, 329.
[2]) Münch. med. Wochenschr. No. 45, 1896.
J. pr. Chem. **56**, 393 (1897); **57**, 365 (1898).
[3]) J. pr. Chem. [2] **31**, 138 (1885).
[4]) Chem. Centr. 1875, S. 395, 411, 426.
[5]) Z. physiol. Chem. **21**, 319 (1896).

C. A. C. Schmidt[1]) untersuchte die Bildung der Halogenwasserstoffsäuren bei der Halogenierung und ihren Einfluß auf die Umsetzung von Halogen und Eiweiß.

Bald darauf folgte die Isolierung halogenierter Eiweißspaltungsprodukte.

Wheeler und Jamieson[2]) stellten kristallisiertes Dijodtyrosin dar, aber nicht in maximaler Ausbeute, die A. Oswald[3]) durch Jodieren mit Jodpulver bei 0° gelang. Oswald stellte ferner Monojodmethylindol[4]) dar, vermochte aber nicht Phenylalanin[5]) zu jodieren im Widerspruch zu Fürth und Schwarz.[6])

Henze[7]) stellte fest, daß das inaktive Dijodtyrosin mit dem von E. Drechsel im Gerüste der Gorgonia Cavolini entdeckten Gorgonin identisch ist.

Neuberg und Popowski,[8]) veranlaßt durch die Farbreaktionen des Tryptophans mit Brom und Chlor, isolierten und untersuchten diese Halogenverbindungen und sprechen die gelbe als Monobromindol-α-aminopropionsäuredibromid, gedacht als Perhalogenid, die rote als das Monobromid an.

Neuberg[9]) zeigte aber, daß der gelbe Körper um 2 H-atome ärmer und daher alle 3 Hal.-Atome substituiert sein dürften.

Pauly[10]) jodierte Histidin, vermochte aber das Präparat nicht zu isolieren.

Auf einer älteren Arbeit von Gorup Besanez[11]) fußend, beschreibt Carl Th. Mörner[12]) die Methode der Darstellung von Dibromtyrosin und seine Eigenschaften (s. später).

---

[1]) Z. physiol. Chem. **34**, 55, 194 (1901); **35**, 386 (1902); **36**, 343 (1902).
[2]) Am. Chem. J. **33**, 365 (1905).
[3]) Z. physiol. Chem. **59**, 320 (1909).
[4]) Z. physiol. Chem. **60**, 289 (1909).
[5]) Z. physiol. Chem. **58**, 290 (1908).
[6]) Pflüger's Arch. **124**, 115 (1908).
[7]) Z. physiol Chem. **51**, 64 (1907).
[8]) Biochem. Ztschr. **2**, 237 (1906).
[9]) Biochem. Ztschr. **6**, 276 (1907).
[10]) Berl. Ber. **43**, 2243 (1910).
[11]) Ann. Chem. Pharm. **125** [NR 49], 281 (1863).
[12]) Z. physiol. Chem. **88** 124 (1913).

Jendrassik[1]) versuchte die Molekulargröße des Eiweißes auf Grund seiner Jodaufnahmefähigkeit zu bestimmen; Blum und Vaubel[2]) gedachten durch die nach ihrer Jodierungsmethode substituierten und quantitativ bestimmten Jodmengen für die Molekulargröße der einzelnen Eiweißkörper sowie ihrer Derivate zu Vergleichszahlen zu gelangen und so Umwandlungsprozesse in ihren einzelnen Phasen wiederzuspiegeln.

James H. Millard[3]) ermittelt das bei proteolytischen Vorgängen abgespaltene Tyrosin durch Bestimmung der Bromumsetzung quantitativ. Er gewinnt so die Möglichkeit, peptische und tryptische Enzyme zu unterscheiden, da ja Pepsin das Tyrosin nicht abspaltet.

Adrian John Brown und Edmund Theodore Millard[4]) sowie Samuel James Manson Auld und Thomas Duncan, Mosscrop B. Sc.[5]) haben seine Versuche fortgeführt.

Aufgabe der Arbeit.

Aus der mitgeteilten Literatur geht hervor, daß die Eiweißkörper und ein Teil ihrer Spaltungsprodukte Brom binden. Die Bindung, bezüglich der Verbrauch von Brom kann beruhen

1. auf Oxydation unter Bildung von Bromwasserstoff,
2. auf Bromaddition unter Sprengung doppelter Bindung,
3. auf Bromsubstitution.

Herr Professor Siegfried forderte mich auf, zu untersuchen, ob die bei der hydrolytischen Spaltung von Proteinkörpern entstehenden Produkte in geringerem oder höherem Maße als das Ausgangsmaterial Brom bänden. Denn gleichviel, ob die Bindung von Brom nach 1, 2 oder 3 oder gleichzeitig auf mehreren Wegen geschieht, wäre es für die

[1]) Ungar. Arch f. Medizin I, 85, (1892).
[2]) Z. physiol. Chem. 28, 287 (1899).
[3]) Trans. guinness. researche Laboratory 1903. I. part 1.
[4]) Journ. of the chem. Soc. Lond. 1906, S. 145.
[5]) Journ. of the chem. Soc. Lond. Vols. 103 u. 104, S. 281, 1913.

Beurteilung der Hydrolyse von Wichtigkeit, wenn in dem Brombindungsvermögen ein neues Mittel zur Kontrolle der Hydrolyse gefunden würde.

Eigene Untersuchungen.

Für meine Zwecke kam es nicht darauf an, Bedingungen anzuwenden, unter denen etwa ein möglichst hoher Bromverbrauch zu erzielen ist, sondern solche, die sich gleichmäßig genau bei den verschiedenen Bestimmungen einhalten lassen. Deshalb wurden die Bedingungen der Methode der Koppeschaarschen Phenolbestimmung gewählt.

Wie später sich zeigen wird, ist sie der von Millard[1]) zur Bestimmung des Tyrosins gewählten vorzuziehen, da sie sich viel glatter und bequemer ausführen läßt.

Die Koppeschaarsche Methode der quantitativen Phenolbestimmung.

Die bekannte Koppeschaarsche Methode beruht auf dem Brombindungsvermögen des Phenols. Aus einer Lösung von Bromidbromatalkali von bekanntem Wirkungswert wird durch überschüssige Salzsäure Brom frei gemacht.

$$HBrO_3 + 5\,HBr = 3\,Br_2 + 3\,H_2O.$$

Dieses Brom setzt sich mit Phenol zu Tribromphenolbrom um

$$C_6H_2Br_3OBr$$

und wird nach Zusatz von überschüssigem Jodkali in Tribromphenol $C_6H_2Br_3OH$ übergeführt, so daß also die Endumsetzung folgender Gleichung entspricht:

$$C_6H_5OH + 6\,Br = C_6H_2Br_3OH + 3\,HBr,$$

d. h. 6 Atome Brom entsprechen 1 Mol. Phenol. Das aus dem Jodkali freigemachte Brom wird mit $\frac{n}{10}$ Natriumthiosulfat zurücktitriert unter Zusatz von Stärkelösung als Indikator am Ende der Reaktion.

[1]) Journ. of the chem. Soc. Lond. 1906, S. 145.

I. Methodisches.

Ungefähr 0,2—0,05 g der Substanz, in weiter unten zu erörternder Weise nötigenfalls vorbereitet, werden in kaltem Wasser gelöst; es wird darauf gesehen, daß das Volumen der zu titrierenden Flüssigkeit ungefähr 50 ccm beträgt. Ist es nicht möglich in reinem Wasser Lösung zu erzielen, so wird tropfenweise konzentrierte Salzsäure bis zur Lösung zugesetzt und sorgfältig vor dem Zusetzen der Bromsalzlösung mit Natronlauge bis zur schwach sauren Reaktion abgestumpft. Die Konzentration der zu titrierenden Lösungen ist von Einfluß auf die Wechselwirkung von Brom und Substanz. Ammoniakzusatz muß unter allen Umständen vermieden werden, da er die Bestimmung stört (s. weiter unten).

Die Titration wird am besten in farblosen, enghalsigen Flaschen mit sehr gut eingeriebenen Stopfen vorgenommen, in entsprechender Weise numeriert, um Verwechselung der Stopfen und die damit verbundenen Fehler auszuschließen.

Zu den auf die beschriebene Weise hergestellten Lösungen werden aus einer Bürette tropfenweise (um Nachlaufen zu verhindern) in einem gewissen Tempo (60 Tropfen in der Minute) 50 ccm der Bromsalzlösung zugelassen, indem der Ausfluß der Bürette an den Flaschenhals angelegt wird, so daß die Flüssigkeit an der Flaschenwandung hinablaufen muß, da anderenfalls durch einfallende Tropfen Herausspritzen trotz des engen Flaschenhalses nicht zu vermeiden ist. Später wurde aus Bequemlichkeitsgründen die Bromsalzlösung in ihrer Stärke verdoppelt und dementsprechend nur 25 ccm verwendet. Nach Abspritzen des Halses werden aus einer Pipette 5 ccm 25%ige

Salzsäure zugegeben, der Stopfen aufgesetzt, umgeschüttelt und bei Zimmertemperatur in verstreutem Tageslicht eine Viertelstunde stehen gelassen. Treten Fällungen ein, so ist in dieser Zeit ab und zu zu schütteln. Hierauf wird der Glasstopfen abgenommen und 10 ccm einer wässrigen, 12,5%igen Jodkaliumlösung aus einer Pipette zugefügt, nach Verschließen der Flasche umgeschüttelt, um alle Bromdämpfe umzusetzen, und endlich nach Abspritzen des Stopfens und Flaschenhalses mit $\frac{n}{10}$ Natriumthiosulfatlösung tropfenweise, um Überschuß des $Na_2S_2O_3$ zu vermeiden, bis zur schwachen Gelbfärbung zurücktitriert. Dann erfolgt Zusatz der Stärkelösung. Als Umschlag ist Übergang von Blau in Farblos anzunehmen.

Das Jodkali ist vor seiner Benutzung auf Reinheit (KJO_3) zu untersuchen.

Einstellen der Bromsalzlösung gegen Natriumthiosulfat $\frac{n}{10}$.

a) In eine Glasstopfenflasche werden in oben geschilderter Weise 50 ccm (resp. 25 ccm) Bromsalzlösung eingelassen, 5 ccm konz. Salzsäure zugegeben, durch vorsichtiges Schwenken gemischt und 10 ccm Jodkaliumlösung zugesetzt. Abermaliges Mischen durch Schwenken, Abspritzen der Wandungen, Zurücktitrieren!

50 ccm Bromsalzlösung werden eingestellt auf 30 ccm $Na_2S_2O_3$ $\frac{n}{10}$. Die Kontrolltitrationen der eingestellten Bromsalz-Lösung gegen $Na_2S_2O_3$ $\frac{n}{10}$ geben stets sehr genau 50 ccm = 30 ccm.

Vorgelegt 50 ccm Bromsalzlösung = 30 ccm $Na_2S_2O_3$	Zurücktitrierte ccm $Na_2S_2O_3$ $\frac{n}{10}$
1. Titration	30,00
2. „	29,98
3. „	30,01
4. „	29,99

Bei 4 wurde nach dem KJ-Zusatz mit dem Zurücktitrieren $^1/_4$ Stunde gewartet.

Der nach diesem Verfahren erhaltene Titer ist für alle späteren Untersuchungen maßgebend.

b) Verfährt man jedoch bei der Einstellung des Titers so, daß nach Freiwerden des Broms mit aufgesetztem Stöpsel geschüttelt wird, so sieht man bei Zusatz der Jodkaliumlösung Bromdämpfe entweichen. Titriert man dann nach Umschütteln der wieder verschlossenen Flasche zurück, so bekommt man wegen des Bromverlustes keine scharfe Titereinstellung.

50 ccm Bromsalzlösung waren auf 30 ccm $Na_2S_2O_3$ $\frac{n}{10}$ nach a eingestellt und wurden nach b kontrolliert.

Es wurden gefunden:

50 ccm Bromsalzlösung gleich
1. 29,65 ccm $Na_2S_2O_3$ $\frac{n}{10}$
2. 29,80 „ „
3. 29,60 „ „
4. 29,69 „ „
5. 29,55 „ „
6. 29,60 „ „
7. 29,65 „ „
8. 29,78 „ „
9. 29,80 „ „

267,12 : 9 = 29,68.

Durchschnittsverlust 0,32 ccm.

Es tritt also Bromverlust ein, und zwar kein regelmäßiger. Indessen wurden bei den weiter unten noch zu beschreibenden Phenoltitrationen zur Kontrolle meiner Lösungen sehr genaue Resultate erhalten. Es erklärt sich dies dadurch, daß von dem Phenol, das nach Koppeschaars Erfahrungen in einem dem freiwerdenden Brom entsprechenden Verhältnis stehen muß, um genaue Resultate zu erhalten, der größere Teil des Broms gebunden ist, so daß ein Bromdampfverlust nicht eintritt, wenn der Stöpsel bei Zusatz des Jodkaliums gelüftet wird.

Da nun bei den folgenden Bestimmungen der Aminosäuren u. s. w. vor dem Jodkaliumzusatz geschüttelt und der Stöpsel gelüftet werden muß, so ist, da während der viertelstündigen Bromeinwirkung sich reichlich Bromdämpfe über der Lösung sammeln, bei Substanzen, die wenig oder gar kein Brom aufnehmen, mit Bromverlust zu rechnen, und die Titerstellung nach b als maßgebend anzusehen, für Substanzen, die starkes Brombindungsvermögen zeigen, der nach a erhaltene Titer.

Um diese Schwierigkeit zu umgehen, vermied ich jeden Bromverlust durch folgenden Kunstgriff.

1. Geringe Modifikation der Methode.

c) Zusetzen der Jodkaliumlösung, ohne den Stöpsel vollkommen zu lüften.

Die Flasche, in die die Jodkaliumlösung gebracht werden soll, wird kurze Zeit unter Leitungswasser abgekühlt. Dann wird der Rand zwischen Glasstopfen und Hals mit einem Ring Jodkaliumlösung überschichtet und der Stopfen ein wenig gelüftet. Sofort wird die Jodkaliumlösung in die Flasche gesaugt und man hat nur Sorge zu tragen, daß die Lösung aus

der Pipette kontinuierlich nachfließt. So kann man mit Leichtigkeit die Jodkaliumlösung in die Flasche bringen, ohne den geringsten Bromverlust, wie sich durch Kontrollversuche zeigte. Vorteilhaft werden flache Stopfen verwendet, da sich zwischen Flaschenhalsrand und der überstehenden Scheibe des Stopfens größere Flüssigkeitsmengen halten können.

Vorgelegt sind 50 ccm Bromsalzlösung = 30 ccm $Na_2S_2O_3$ $\frac{n}{10}$ nach a)	nach c) zurücktitrierte ccm $Na_2S_2O_3$ $\frac{10}{n}$
1. Titration	29,90
2. „	30,00
3. „	30,00
4. „	29,95
5. „	29,97
6. „	29,98
7. „	30,00

2. Beeinflussung des Titers durch die zwischen Salzsäurezusatz und Zurücktitrieren liegende Zeit.

Da später Untersuchungen über die Einwirkung von Brom in verschiedenen Zeiten ausgeführt wurden, so war es nötig, die in der Methode begründeten Fehler und ihre Grenzen festzustellen. Einmal kann Verlust durch Schwinden von Brom zwischen Hals und Stopfen während des langen Stehens eintreten, andrerseits könnte Brom reduziert werden. Bei den Titrationen wurde nicht in der modifizierten Weise verfahren, sondern der Stopfen ganz gelüftet, sodaß der Durchschnittsverlust 0,32 aufzurechnen ist.

50 ccm Bromsalzlösung entsprechen 30 ccm $Na_2S_2O_3$ $\frac{n}{10}$ (Titer nach a).

	Zurücktitrierte ccm $Na_2S_2O_3$ $\frac{n}{10}$	Zeit des Stehens bis zum Titrieren
1.	29,45	13 × 24 Stunden
2.	29,55	13 × 24 „
3.	29,55	19 × 24 „
4.	29,45	26 × 24 „
5.	27,40	98 × 24 „
6.	29,15	98 × 24 „
7.	29,40	98 × 24 „

Man sieht, daß ein den langen Zeiten gegenüber sehr geringer Verlust eintritt, der für die Beurteilung der Untersuchungen später nicht ins Gewicht fällt. Die Flaschen waren mit Bindfaden fest zugebunden und in einem dunklen Schrank aufbewahrt worden.

3. Beeinflussung des Titers durch die zwischen Jodkaliumzusatz und Zurücktitrieren liegende Zeit.

50 ccm Bromidbromatlösung (= 29,95 ccm $\frac{n}{10}$ Thiosulfatlösung) wurden nach Zusatz der Salzsäure und Mischen durch vorsichtiges Schwenken in offener Flasche nach sofortigem Zusatz der Jodkaliumlösung verschlossen, $^1/_4$ Stunde sich selbst überlassen und dann zurücktitriert.

Zurücktitrierte ccm $Na_2S_2O_3$ $\frac{n}{10}$:

1. 29,93
2. 29,90

Es zeigte sich also, daß Warten mit dem Zurücktitrieren nach Jodkaliumzusatz ohne Einfluß auf den Titer bleibt. Trotzdem ist es möglich, daß bromierte Aminosäuren oder Spaltungsprodukte des Eiweißes durch längeres Stehen mit freiem Jod Umsetzungen erleiden (s. später).

4. Einfluß anwesenden Ammoniaks und von Ammonsalzen.

Da auffallender Weise in der Arbeit von Brown und Millard[1]) bemerkt wird, daß die Methode der Tyrosinbestimmung von J. H. Millard[2]) (Messen des allmählich zufließenden, durch Tyrosin gebundenen Broms) weder durch Ammonsalze noch Amide und Aminosäuren, wie Asparagin, Asparaginsäure, Leucin und Phenylalanin, Spaltungsprodukte der vollständigen Säureproteolyse, gestört werde, untersuchte ich das Verhalten von Ammoniak und Ammonsalzen gegenüber der Koppeschaarschen Reaktion, da NH_3 und Br auf einander einwirken und bei Beobachtung des Verlaufes der Hydrolysen mit Ammoniakabspaltung und Ammonsalzbildung zu rechnen war. Auf die Aminosäuren und Amide wird später eingegangen.

Bei dem Zugeben der Jodkaliumlösung wurde der Stopfen gelüftet.

50 ccm Bromsalzlösung entsprachen 29,95 ccm $Na_2S_2O_3\frac{n}{10}$. Die Einwirkung des freien Broms dauerte $^1/_4$ Stunde in geschlossener Flasche.

	Zurücktitrierte ccm $Na_2S_2O_3\frac{n}{10}$	Dem umgesetzten Brom entsprechende ccm $Na_2S_2O_3\frac{n}{10}$
50 ccm Bromidbromatlösung mit 5 ccm NH_3, 10% ig, und 10 ccm HCl, 25% ig, versetzt, wurden zurücktitriert.	21,55	8,40
5 ccm NH_3, 10% ig, wurden mit 5 ccm HCl, 25% ig, versetzt (saure Reaktion). Dazu wurden 50 ccm Bromsalzlösung gelassen, 5 ccm konz. Salzsäure zugefügt und zurücktitriert.	21,30	8,65

[1]) Journ. of the chem. Soc. Lond. 1906, S. 145.

[2]) Trans. guinness researche Laboratory 1903 1. part. I.

	Zurücktitrierte ccm $Na_2S_2O_3\frac{n}{10}$	Dem umgesetzten Brom entsprechende ccm $Na_2S_2O_3\frac{n}{10}$
1 g Ammonchlorid wurde in wenig Wasser gelöst, 50 ccm Bromidbromatlösung zugelassen, 5 ccm konz. Salzsäure zugegeben und zurücktitriert. Quotient 19,68 s. später.	20,45	9,50
5 ccm Natronlauge wurden mit 5 ccm konz. Salzsäure versetzt (schwach saure Reaktion), 50 ccm Bromsalzlösung zugelassen, 5 ccm konz. Salzsäure zugegeben und zurücktitriert.	29,90	0,05

Nach diesen Titrationen haben also Ammoniak und Ammonsalze Einfluß auf die Bestimmungswerte, Natronlauge oder Natriumchlorid bleiben ohne Wirkung. Es wurde allerdings eine große Menge Ammonchlorid bei den obigen Versuchen angewendet, doch kommen immerhin auf 19,68 Atome Stickstoff 1 Atom Brom.

5. Talkum als Hilfsmittel bei der Titration von Proteinkörpern.

Eine Schwierigkeit bei der Titration mancher Substanzen, besonders Gelatine, besteht darin, daß auf Jodkaliumzusatz Bildung klumpender Schmieren eintritt, die sich nicht titrieren lassen.

Dieser Übelstand läßt sich vermeiden durch Zusatz von Talkumpulver vor Zusatz der Salzsäure. Man schüttelt vor Zusatz der Jodkaliumlösung noch einmal das Talkum auf, läßt in üblicher Weise die Jodkaliumlösung zu, so vorsichtig, daß sie sich über oder unter die Lösung der Flasche schichtet, und mischt durch einen plötzlichen Ruck und folgendes lebhaftes Schütteln, um möglichst feine Verteilung des Reaktionsgemisches zu erhalten. Die Titration des Jodes läßt sich dann glatt ausführen.

Prüfung der Maßflüssigkeiten durch Phenolbestimmungen nach Koppeschaar.

3,3 g frisch destilliertes Phenol Kahlbaum, Sdp. 183° C, werden mit destilliertem Wasser zu einem Liter gelöst und 10 ccm dieser Lösung (= 0,033 g Phenol) der Bestimmung unterworfen.

Die nötigen Lösungen:

1. $Na_2S_2O_3 \frac{n}{10}$ = 24,832 g im Liter.
2. KJ-Lösung = 125,0 g „ „
3. Salzsäure = 25%ig.
4. Stärkelösung, lösliche, Stärke in siedendem Wasser gelöst.
5. Bromsalzlösung: Kbr ungefähr 6 g und $KBrO_3$ 1,6711 g im Liter. 50 ccm = 30 ccm $Na_2S_2O_3 \frac{n}{10}$.

Es tritt auf Zusatz der Salzsäure allmählich weiße Fällung ein und die Bromfarbe verschwindet fast ganz. Während der viertelstündigen Bromierung wird ab und zu umgeschüttelt und auf Zusatz der Jodkaliumlösung 10 Minuten gewartet.

Es entsprachen dem umgesetzten Brom:

1. 21,07 ccm $Na_2S_2O_3$
2. 21,01 „ „

1 Mol. Phenol (Mol. Gew. 94,05) bindet 6 Atome Brom. $^1/_{60000}$ Mol. Phenol ist gleich 1 ccm $Na_2S_2O_3 \frac{n}{10}$ = 0,0015675 g Phenol.

Demnach 1. 0,0015675 · 21,07 = 0,0330 g Phenol
2. 0,0015675 · 21,01 = 0,0329 g „ .

Es ergab sich hieraus die Genauigkeit der Lösungen.

Für jeden Fall wurde bei Erneuerung meiner Lösungen durch Phenolbestimmungen kontrolliert.

II. Untersuchung der verschiedenen Aminosäuren.

Das Verhalten der Aminosäuren, der letzten Spaltungsprodukte der Eiweißkörper, zu Brom unter den Bedingungen der Koppeschaarschen Reaktion war angezeigt wegen der in der Literatur teilweise sich widersprechenden Angaben über ihr Verhalten zu Halogenen. Überdies finden sich Feststellungen über die Umsetzung von Eiweißkörpern oder deren Spaltungsprodukten mit Brom unter den Bedingungen der Koppeschaarschen Reaktion überhaupt nicht. Endlich war die Frage zu beantworten, ob die bekannten Aminosäuren isoliert und für sich bromiert in Summa annähernd dieselbe Menge Brom umsetzen wie gekuppelt z. B. im Eiweißmolekul.

Trifft nämlich letzteres nicht zu, so ist ohne weiteres anzunehmen, daß Brom im Eiweißmolekul nicht nur substituierend in die gekuppelten Aminosäuren eintritt, sondern daß die Verkettung der Aminosäuren untereinander von Einfluß auf den Bromverbrauch ist. Es kann das Additionsvermögen von Brom bei den verketteten Aminosäuren höher sein als bei den freien, ebenso wie die Substitution und Oxydation, und beiden letzteren Vorgängen entsprechend Reduktion von Brom zu HBr.

Ferner ist zu bedenken, daß durch die Einwirkung von überschüssigem Brom an den Kuppelstellen Abspaltung einzelner Aminosäuren oder größerer oder kleinerer Aminosäurenkomplexe stattfinden kann, und daß dadurch die Bromumsetzung gesteigert wird.

Umgekehrt müßten dann im Verlaufe des allmählichen Abbaues des Eiweißmolekules durch Spaltungsmittel die Phasen dieses Prozesses sich in entsprechender Abnahme der Brom-

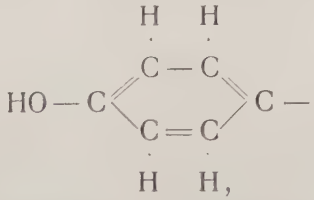
umsetzung zu erkennen geben. Bei den späteren Versuchen wird darauf noch näher eingegangen werden, besonders deshalb, weil ja umgekehrt Aminosäuren isoliert wohl Brom zu binden imstande sein können, in gekuppeltem Zustande aber nicht, z. B. das Tyrosin.[1])

Endlich ist die aus den Aminosäuren und Eiweißkörpern durch die Behandlung nach Koppeschaar oder im Verlauf der hydrolytischen Spaltung mögliche Ammoniakbildung in Betracht zu ziehen, durch die ein gesteigerter Bromverbrauch eintreten müßte, welcher das vielleicht abnehmende Brombindungsvermögen des Eiweißrestes und der Spaltstücke verdecken könnte.

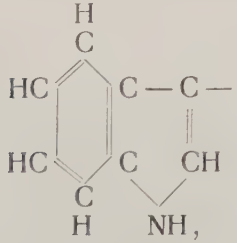
Um also an den einfachsten Bausteinen des Eiweißes die Koppeschaarsche Reaktion studieren zu können und die spätere Untersuchung von größeren Komplexen des Eiweißabbaues besser übersehen zu können, schritt ich zur Untersuchung verschiedener Aminosäuren.

Bekannt ist das Brombindungsvermögen (s. Literaturangaben in der Einleitung) des Tyrosins, Tryptophans und Histidins; alle drei Verbindungen enthalten einen ringförmigen Komplex:

Tyrosin den p. Oxyphenyl-Ring,

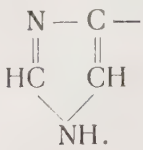


Tryptophan den Indolkomplex,



[1]) Brown and Millard; Journ. of the chem. Soc. Lond. 1906, S. 145.

Histidin den Imidazolring,



Im Tyrosin kommt der Phenolkern für die Substitution in Frage, allerdings nach Oswald[1]) erst durch die Gegenwart der OH-Gruppe. Trotzdem lag die Versuchung nahe, andere einen Phenolkern, wenn auch ohne OH-Gruppe, enthaltende Aminosäuren nach Koppeschaar zu behandeln, wie Phenylalanin (Phenyl-α-aminopropionsäure), das nach Fürth und Schwarz[2]) jodbindend sein soll, nach A. Oswald[1]) nicht, ferner Phenylglykokoll, über das mir keine Angaben in der Literatur bekannt sind. Ferner fragte es sich, ob auch unter den keine ringförmige Bindung enthaltenden Aminosäuren sich brombindende fänden, und ob Aminosäuren sich anders verhalten als ihre Amide und Ester.

1. Aufstellung des Quotienten $\frac{N}{Br}$.

In allen folgenden Bestimmungen wird das Resultat der Behandlung der Aminosäuren und Eiweißspaltungsprodukte nach der Koppeschaarschen Methode als Zahl ausgedrückt, die angibt, wieviel Atome N einem nicht zurücktitrierbaren Atome Brom entsprechen. Man erhält die Zahl nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Gew. d. Subst. i. Gramm.} \times \text{Zahl d. i. 1 Mol. enth. At. N}}{\text{Mol. Gew. d. Subst.} \times \text{umges. Br. i. ccm } \frac{n}{10} \text{ Lösg.} \times 0{,}0001}$$

d. h. durch Division des Gewichtes der Substanz mit dem Molekulargewicht erhält man die Anzahl der Moleküle der

[1]) A. Oswald; Hoppe Seyler **58**, 290 (1908).
[2]) Fürth und Schwarz; Pflügers Arch. **124**, 113 (1908).

Substanz; diese wird durch die Zahl der Atome umgesetzten Broms dividiert, erhalten durch Multiplikation der in 1 ccm $\frac{n}{10}$ Bromlösung enthaltenen 0,0001 Atome Brom mit der ccm-Zahl des umgesetzten Broms. Dabei ist noch zu berücksichtigen, wieviel ein Molekul Substanz Atome N enthält. Mit dieser Zahl muß das Resultat multipliziert werden.

Beispiel:

Tyrosin 0,0539 g umgesetztes Brom 13,02 ccm $\frac{n}{10}$ Br

Mol. Gew. 181,09 g

$$\frac{0{,}0539 \cdot 1}{181{,}09 \cdot 13{,}02 \cdot 0{,}0001} = \frac{539}{2357{,}7918} = 0{,}23$$

Quotient: 0,23.

2. Untersuchung von Aminosäuren ohne ringförmigen Komplex.

Monaminosäuren, einbasische und zweibasische: Glykokoll; Alanin; α-Aminovaleriansäure; Leucin; Aminobernsteinsäure; Glutaminsäure; Sarkosin; Betaïn.

Diaminosäuren: Lysindichlorid; Arginindinitrat.

Amide der Aminosäuren: Asparagin.

Ein Peptid: salzsaures Glycylglycin.

a) Zeit der Bromierung $^1/_4$ Stunde. Lüften des Stopfens bei Zusatz des Jodkaliums.

In allen Fällen wurde, wenn nichts anderes bemerkt ist, die Substanz in ungefähr 50 ccm kaltem Wasser gelöst. Die Substanzen stammten von Kahlbaum-Berlin, soweit sie nicht von mir dargestellt wurden. Die zur Bromierung zugefügte Menge Bromidbromatlösung wird angegeben durch die Kubikzentimeterzahl (... ccm Bromidbromatlösung). Der Titer (z. B. Titer 29,00) dieser Lösung besagt, daß 50 ccm

derselben der in der Klammer angegebenen Zahl ccm Natriumthiosulfatlösung $\frac{n}{10}$ entsprechen. Das gebundene Brom wird ausgedrückt in ccm $\frac{n}{10}$ Bromlösung. Die Zahl der ccm ergibt sich aus der Differenz der dem gesamten freien Brom entsprechenden ccm $Na_2S_2O_3$ $\frac{n}{10}$ und den zurücktitrierten ccm $Na_2S_2O_3$ $\frac{n}{10}$.

Ist die Bromumsetzung so gering, daß sie noch in der Fehlergrenze (0,32 ccm) liegt oder wenige Zehntel ccm darüber, wird der Quotient nicht ausgerechnet, da sich kein praktisch brauchbarer Wert daraus ergibt.

Glykokoll, Aminoessigsäure. Mol. Gew. 75,04.

$$\begin{matrix} CH_2 \cdot COOH \\ \diagdown \\ NH_2 \end{matrix}$$

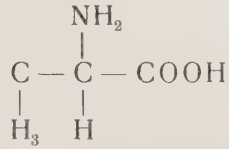
1. 0,06315 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,15
   zurücktitriert. Natriumthiosulfat 29,95 ccm
   umgesetztes Brom 0,20 ccm
   Quotient = ∞

2. 0,2734 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 29,80
   zurücktitriert. Natriumthiosulfat 29,15 ccm
   umgesetztes Brom 0,65 ccm
   Quotient = ∞

3. 0,2118 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,00
   zurücktitriert. Natriumthiosulfat 29,35 ccm
   umgesetztes Brom 0,65 ccm
   Quotient = ∞

4. Es wurde ein Glykokoll verwendet, das aus Perhydrol umkristalliert worden war.
   0,3256 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 29,80
   zurücktitriert. Natriumthiosulfat 29,45 ccm
   umgesetztes Brom 0,35 ccm
   Quotient = ∞

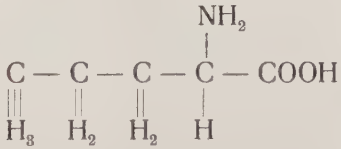
Alanin, α-Aminopropionsäure. Mol. Gew. 89,06.



5. 0,2709 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 29,80
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 29,60 ccm
umgesetztes Brom 0,20 ccm
Quotient = ∞

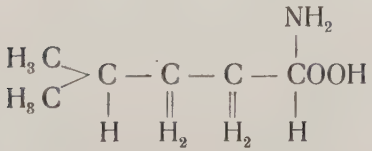
6. 0,2501 g. 50,28 ccm Bromidbromatlösung, Titer 29,80
entsprechen $\frac{n}{10}$ Natriumthiosulfat 29,97 ccm
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 29,65 „
umgesetztes Brom 0,32 ccm
Quotient = ∞

α-Amidovaleriansäure. Mol. Gew. 117,09.



7. 0,1052 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,05
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 29,70 ccm
umgesetztes Brom 0,35 ccm
Quotient = ∞

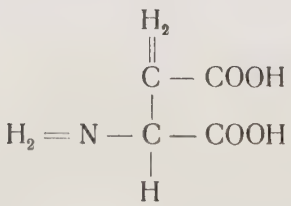
Leucin, α-Aminoisocapronsäure,
α-Aminoisobutylessigsäure.
Mol. Gew. 131,10.



Die Substanz wurde im Exsikkator bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Lösung in Wasser zu einer vollkommen klaren Flüssigkeit durch Zusatz einiger Tropfen konz. Salzsäure erreicht.

8. 0,0990 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,05
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 29,95 ccm
umgesetztes Brom 0,10 ccm
Quotient = ∞

Asparaginsäure, Aminobernsteinsäure. Mol. Gew. 133,06.

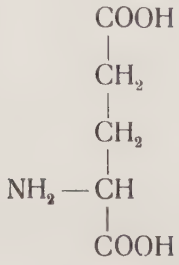


9. 0,1080 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,15
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 28,90 ccm
umgesetztes Brom 1,25 ccm
1 At Br = 6,49 Atome N.

10. Die bei 9 verwendete Asparaginsäure wurde zur Reinigung aus heißem Wasser umkristallisiert.
0,1290 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 29,80
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 29,50 ccm
umgesetztes Brom 0,30 ccm
Quotient = ∞

11. Asparaginsäure wie bei 10. 0,5206 g gelöst in 100 ccm Wasser. Davon 10 ccm verarbeitet.
0,05206 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 29,80
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 29,69 ccm
umgesetztes Brom 0,11 ccm
Quotient = ∞

Glutaminsäure, α-Amino-n-glutarsäure,
α-Amino-n-brenzweinsäure.
Mol. Gew. 147,07.



12. Lösung der sehr schwer in kaltem Wasser löslichen Substanz wurde in allen Fällen durch einige Tropfen konzentrierter Salzsäure erreicht.
0,1184 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,05
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 29,85 ccm
umgesetztes Brom 0,20 ccm
Quotient = ∞

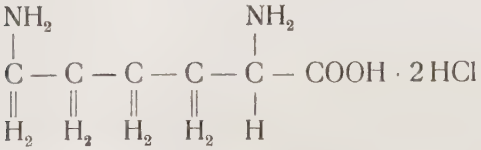
13. 0,1692 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,00
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 29,50 ccm
umgesetztes Brom 0,50 ccm
Quotient = ∞

14. 0,1656 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,00
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 29,62 ccm
umgesetztes Brom 0,38 ccm
Quotient = ∞

15. 0,2745 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,00
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 29,15 ccm
umgesetztes Brom 0,85 ccm
Quotient = ∞

16. 0,2024 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,00
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 29,60 ccm
umgesetztes Brom 0,40 ccm
Quotient = ∞

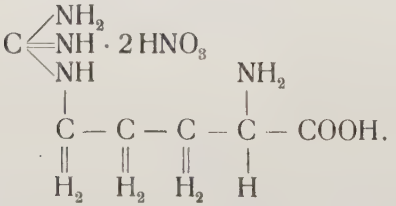
Lysindichlorid, dargestellt aus Gelatine durch Zersetzen mit Salzsäure.
α-ε-diaminocapronsäuredichlorid.
Mol. Gew. 218,94.



Die Substanz wurde bis zur Gewichtskonstanz im Exsikkator getrocknet.

17. 0,0993 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,05
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 29,70 ccm
umgesetztes Brom 0,35 ccm
Quotient = ∞

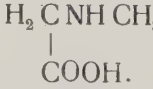
Arginindinitrat, dargestellt aus Gelatine durch Zersetzen mit Salzsäure.
Guanidin-α-aminovaleriansäuredinitrat.
Mol. Gew. 300,18.



Die Substanz wurde bis zur Gewichtskonstanz im Exsikkator getrocknet.

18. 0,2130 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 29,80
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 29,10 ccm
umgesetztes Brom 0,70 ccm
Quotient = ∞

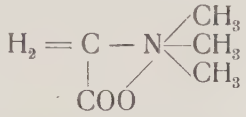
Sarkosin, Methylglykokoll. Mol. Gew. 89,06



19. 0,1400 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 29,98
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 29,50 ccm
umgesetztes Brom 0,48 ccm
Quotient = ∞

20. 0,1239 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,00
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 29,75 ccm
umgesetztes Brom 0,25 ccm
Quotient = ∞

Betaïn, Trimethylglykokoll. Mol. Gew. 117,09.



Die sehr hygroskopische Substanz wurde über Schwefelsäure bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

21. 0,0966 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,05
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 29,61 ccm
umgesetztes Brom 0,44 ccm
Quotient = ∞

Asparagin, Aminobernsteinsäureamid. Mol. Gew. 132,08.

22. 0,1087 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,05
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 29,81 ccm
umgesetztes Brom 0,24 ccm
Quotient = ∞

23. 0,1939 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,00
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 29,80 ccm
umgesetztes Brom 0,20 ccm
Quotient = ∞

24. 0,2207 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,00
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 29,85 ccm
umgesetztes Brom 0,15 ccm
Quotient = ∞

b) Ohne Lüften des Stöpsels bei Zusatz des Jodkaliums. Glykokoll, Alanin Arginindinitrat.

Nach Bestimmung 1 bis 24 setzt keine der freien Aminosäuren oder Amide und Ester derselben ohne Ring nennenswerte Brommengen unter den Bedingungen der Koppeschaarschen Reaktion um. Dennoch wurden die drei genannten, ohne den Stöpsel zu lüften, nochmals bestimmt, um zu sehen, ob wirklich die geringe Bromumsetzung der bis jetzt ausgeführten Bestimmungen auf Bromverlust zurückzuführen ist.

Es wurde dasselbe Material verwendet wie bei den vorigen Bestimmungen und $^1/_4$ Stunde bromiert. In jedem Falle wurden 50 ccm Bromidbromatlösung zugesetzt. (Titer 30,00).

Substanz	laufende No.	Menge in g	Dem umgesetzten Brom entsprechende ccm $\frac{n}{10}$ Bromlösung	Quotient
Glykokoll	25	0,1071	0,05	∞
Alanin	26	0,1444	0,00	∞
„	27	0,3957	0,10	∞
Arginindinitrat	28	0,0648	0,08	∞
„ „	29	0,0907	0,22	∞

Bromverbrauch ist also gleich 0, der Verlust an Brom fast 0.

c) Zeit der Bromeinwirkung länger als $^1/_4$ Stunde. Lüften des Stöpsels vor Jodkaliumzusatz.

Bei längerer Dauer der Bromeinwirkung war zu bestimmen, ob der Quotient derselbe bleibt oder fällt. Das Fallen kann durch Substitution oder Addition von Brom verursacht werden oder auch durch Spaltung der Aminosäuren.

Da mit starkem Bromverbrauch bei längerer Einwirkung zu rechnen war, wurden bei verschiedenen Bestimmungen relativ doppelte Mengen Bromidbromatlösungen angewendet.

Vielleicht konnte sich auch, entsprechend dem größeren Bromüberschuß, stärkere Bromumsetzung zeigen.

Die in Klammer hinter den Quotienten bei Alanin aufgeführten Zahlen bedeuten die korrigierten Quotienten, erhalten, indem man von den Kubikzentimetern umgesetzten $\frac{n}{10}$ Broms 0,32 ccm als Verlust abzieht, der durch Lüften des Stöpsels vor Zusatz des Jodkaliums eintritt. Ist die Brombindung gering, so muß der Fehler im Quotienten sehr groß werden. Denn wenn wie bei Nr. 30 z. B. der Methodenfehler ungefähr $^1/_5$ des ganzen Bromverbrauches ausmacht, schwankt der Quotient entsprechend zwischen 16,62 und 21,47. Angabe der Stundenzahl bedeutet Dauer der Bromeinwirkung. Alle Flaschenstöpsel wurden durch Ligaturen gesichert, die Flaschen bei Zimmertemperatur in einem dunklen Schrank aufbewahrt.

Glykokoll. 36 Stunden:

29. 0,2735 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,15
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 29,65 ccm
umgesetztes Brom 0,50 ccm
Quotient = ∞

Alanin. 2 Stunden:

30. 0,2295 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,15
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 28,60 ccm
umgesetztes Brom 1,55 ccm
Quotient = 16,62 (21,47)

Alanin. 12 Stunden:

31. 0,0993 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,05
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 28,89 ccm
umgesetztes Brom 1,16 ccm
Quotient = 9,61 (13,76)

Alanin. 24 Stunden:

32. 0,1190 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,15
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 27,85 ccm
umgesetztes Brom 2,30 ccm
Quotient = 5,81 (6,85).

0,4133 g Alanin wurden in 100 ccm kaltem Wasser gelöst und zu Versuch 33) 25 ccm davon verwendet.

Alanin. 13 × 24 Stunden.

33. 0,1033 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,05
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 26,58 ccm
umgesetztes Brom 3,47 ccm
Quotient = 3,34 (3,72).

Molekulare Mengen Glykokoll und Alanin.
Für 9 Bestimmungen wurden 0,7504 g Glykokoll und 0,8906 g Alanin zusammen in kaltem Wasser gelöst und auf 100 ccm aufgefüllt. Von dieser Lösung wurden je 10 ccm zu einer Bestimmung verarbeitet, also 0.07504 g Glykokoll + 0,08906 g Alanin = 0,16410 g Substanz, enthaltend 2 At. Stickstoff. 50 ccm Bromidbromatlösung (Titer 30,05).

	Stunden der Brom-einwirkung.	Zurücktitrierte ccm $Na_2S_2O_3$ $\frac{n}{10}$	Umgesetztes Brom in ccm Br $\frac{n}{10}$ ausgedrückt	Quotient
34	23	29,10	0,95	21,05
35	40	29,00	1,05	19,04
36	3 × 24	28,15	1,90	10,52
37	6 × 24	28,05	2,00	10,00
38	11 × 24	27,29	2,76	7,24
39	17 × 24	27,00	3,05	6,55
40	40 × 24	26,48	3,57	5,60
41	154 × 24	25,25	4,80	4,16
42	154 × 24	25,20	4,85	4,12

Asparaginsäure. 10 Stunden:

43. 0,0623 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 31,15
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 30,45 ccm
umgesetztes Brom 0,70 ccm
Quotient = **6,69**.

Für Bestimmung 44, 45, 46 wurden 0,3380 g Asparaginsäure in kaltem Wasser mit tropfenweis zugesetzter Salzsäure gelöst, auf 50 ccm aufgefüllt und davon je 15 ccm verarbeitet, also je 0,1014 g Asparaginsäure. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,05.

	Stunden der Brom-einwirkung.	Zurücktitrierte ccm $Na_2S_2O_3$ $\frac{n}{10}$	Umgesetztes Brom in ccm Br $\frac{n}{10}$ ausgedrückt	Quotient
44	12	28,81	1,24	6,15
45	72	27,75	2,30	3,31
46	13 × 24	25,30	4,75	1,61

Für Bestimmung 47, 48, 49, 50, 51 wurden 1,0648 g Asparaginsäure wie oben gelöst, auf 100 ccm gebracht und davon je 20 ccm verarbeitet, also je 0,21296 g Asparaginsäure. Zugesetzt wurden 50 ccm Bromidbromatlösung (Titer 29,98) bei 47, 48, 49; 75 ccm bei 50. Bei letzterer statt 5 ccm konz. Salzsäure 7,5 ccm.

Bei Bestimmung 51 kamen 15 ccm Asparaginsäurelösung zur Verwendung, also 0,0159 g Asparaginsäure. Zugesetzt wurden 75 ccm obiger Bromidbromatlösung und 7,5 ccm konz. Salzsäure.

Nach 31 Tagen waren die Lösungen wasserfarben geworden, also kein freies Brom mehr vorhanden. Auf Jodkaliumzusatz erfolgte keine Jodabscheidung.

Asparaginsäure wie bei Bestimmung 43 bis 51, aber aus heißem Wasser umkristallisiert.

Für Bestimmung 52 bis 60 wurden 0,5206 g umkristallisierte Asparaginsäure auf 100 ccm gebracht und je 10 ccm verarbeitet, also 0,05206 g Asparaginsäure. Titer der Bromidbromatlösung 29,80. Bromiert wurde 104 Tage.

	Zugesetzte ccm Bromid-bromat-lösung	Zugesetzte ccm konz. H Cl	Zurück-titrierte ccm $Na_2S_2O_3$ $\frac{n}{10}$	Die dem umgesetzten Brom entsprechenden ccm $\frac{n}{10}$ Bromlösung	Quotient
52	50,00	5,0	24.40	5,40	0,72
53	50,00	5,0	25,30	4,50	0,87
54	50,00	5,0	24,20	5,60	0,70
55	50,00	5,0	24,40	5,40	0,72
56	50,00	5,0	24,90	4,90	0,80
57	50,00	5,0	24,45	5,35	0,74
58	100,00	7,5	52,70	6,90	0,57
59	100,00	7,5	54,35	5,25	0,74
60	100,00	7,5	54,10	5,50	0,71

Die in Bestimmung 58 bis 60 verdoppelte Menge freies Brom zeigt keinen Einfluß auf die Brombindung durch die Asparaginsäure.

Glutaminsäure.

Für Bestimmung 61 bis 63 wurden 0,539 g Glutaminsäure in kaltem Wasser durch halbstündiges Schütteln mit tropfenweise zugesetzter konzentrierter Salzsäure gelöst, auf 100 ccm aufgefüllt und davon je 25 ccm verarbeitet, also 0,1347 g Glutaminsäure. Zugesetzt wurden 50 ccm Bromid-bromatlösung, Titer 30,05.

	Stunden der Bromeinwirkung	Zurücktitrierte ccm Natriumthiosulfat-lösung $\frac{n}{10}$	Dem umgesetzten Brom entsprechende ccm $\frac{n}{10}$ Bromlösung	Quotient
61	4×24	26,70	3,35	2,74
62	8×24	25,97	4,08	2,25
63	10×24	25,68	4,37	2,10

Für Bestimmung 64 bis 66 wurden 0,9076 g wie oben gelöst, auf 100 ccm gebracht und für Bestimmung 64 und 65 davon 20 ccm, also 0,1815 g, für Bestimmung 66) 40 ccm, also 0,3630 g verwendet. Zugesetzt wurden 50 ccm Bromid-bromatlösung, Titer 29,98.

Nach 31 Tagen befand sich in keiner Flasche mehr freies Brom, und es trat auch auf Jodkaliumzusatz keine Jodabscheidung ein.

Für Bestimmung 67 bis 72 wurden 0,4492 g Glutaminsäure wie vorher gelöst, auf 100 ccm gebracht und davon 10 ccm verarbeitet, also 0,0449 g.

Bei Bestimmung 67 bis 69 wurden 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 29,98, zugesetzt, bei Bestimmung 70 bis 72) 100 ccm Bromidbromatlösung, Titer 29,98, und 10 ccm H Cl conc.

	Stunden	Zugesetzte ccm Bromidbromatlösung	Zugesetzte ccm H Cl conc.	Zurücktitrierte ccm $Na_2 S_2 O_3$ $\frac{n}{10}$	Dem umgesetzten Brom entsprechende ccm $\frac{n}{10}$ Bromlösung	Quotient
67	112×24	50,00	5,00	24,50	5,48	0,56
68	112×24	50,00	5,00	24,70	5,28	0,58
69	112×24	50,00	5,00	24,80	5,18	0,60
70	123×24	100,00	10,00	53,00	6,96	0,44
71	123×24	100,00	10,00	54,80	5,16	0,59
72	123×24	100,00	10,00	52,40	7,56	0,40

Beim Zurücktitrieren der Bestimmungen 67 bis 72 war es auffallend, daß wenige Minuten nach dem Umschlag in farblos, die blaue Farbe wiederkehrte, also Bromabspaltung eingetreten sein mußte. Ich hob die Proben auf und titrierte nach 2 Tagen nochmals bis zur Farblosigkeit, die sich nun beständig erwies.

Bei 69 und 71 wurden noch 0,2 ccm $Na_2 S_2 O_3$ $\frac{n}{10}$ gebraucht
„ 70 „ „ 0,4 „ „ „
„ 72 „ „ 0,35 „ „ „

Die doppelte Menge zugesetztes Brom blieb anscheinend ohne Einfluß, da Bestimmung 71 mit den übrigen übereinstimmt, die 50 ccm Bromidbromatlösung enthielten, bei Bestimmung 70 und 72, die auch untereinander differieren, Verlust eingetreten sein kann.

Asparagin.

Für Bestimmung 73 bis 76 wurden 1,0286 g in kaltem Wasser gelöst, auf 100 ccm aufgefüllt und davon 20 ccm verarbeitet, also 0,2057 g Asparagin. Zugesetzt wurden 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 29,98.

	Stunden der Bromeinwirkung	Zurücktitrierte ccm $Na_2 S_2 O_3 \frac{n}{10}$	Dem umgesetzten Brom entsprechende ccm Bromidbromatlösung $\frac{n}{10}$	Quotient
73	5×24	11,22	18,76	läßt sich wegen Nachbläuung nicht bestimmen
74	11×24	9,20	20,78	
75	25×24	7,75	22,23	
76	130×24	6,30	23,68	

Stets zeigte sich nach dem Umschlag eine schnelle und starke Nachbläuung, sodaß der für den Quotienten maßgebende Punkt .des Umschlages nicht sicher zu erkennen war. Bei 73 wurden nach $^3/_4$ Stunden schon 3,78 ccm Natriumthiosulfat nachgefüllt,

nach 1 Stunde 1,08 ccm Natriumthiosulfat
„ 24 Stunden 2,10 „ „
„ 6×24 „ 0,20 „ „
„ 21×24 „ 0,25 „ „
„ 27×24 „ 0,25 „ „
zusammen 7,66 ccm

Der Versuch mußte abgebrochen werden, da anscheinend Zersetzung der Lösung eintrat.

Bei 74 wurden nachgefüllt:

nach 2 Minuten 1,00 ccm Natriumthiosulfat
„ 12 „ 0,65 „ „
„ 20 „ 0,75 „ „
„ 35 „ 0,80 „ „
„ 15×24 Stunden 2,10 „ „
„ 21×24 „ 0,25 „ „
zusammen 5,55 ccm „

Auch hier trat dann Zersetzung der Lösung ein.

Bei 75 zeigte sich der Flascheninhalt wasserfarben, sodaß ich annahm, die Umsetzung des freien Broms sei vollkommen beendet und aus Jodkalium deshalb kein Jod mehr frei zu machen möglich. Indessen trat auf Zusatz der 10 ccm Jodkaliumlösung erst schwache Gelbfärbung ein, die schnell in dunkelrotbraune Jodfarbe überging. Als beim Titrieren tropfenweise ungefähr 5 ccm Thiosulfat zugesetzt waren, trat Entfärbung ein, aber sofort darauf Nachbläuung. Der nächste Tropfen entfärbte nur einen Augenblick, und ehe der nächste Tropfen nachfloß, zeigte sich schon wieder starke Bläuung. Dies wiederholte sich bis nach Zusatz von 7,75 ccm Thiosulfat. Dann war die Bläuung $^1/_2$ Minute beständig.

Zur Entfärbung wurden noch zugelassen:

nach 10 Minuten 1,6 ccm Thiosulfat
„ 35 „ 2,8 „ „
zusammen 4,4 ccm Thiosulfat.

Bestimmung 76 zeigte dieselben Erscheinungen wie 75; $^1/_2$ Minute dauernde Entfärbung trat auf Zusatz von 6,30 ccm Thiosulfat ein.

Zur Entfärbung wurden noch zugelassen:

$^1/_2$	Minute	nach	der	Titration	0,5	ccm	Thiosulfat
1	„	„	„	„	0,5	„	„
1,5	„	„	„	„	0,6	„	„
7	„	„	„	„	0,5	„	„

Die Flasche wurde in einen dunkeln Schrank gestellt. Nach 7 Minuten war die Lösung farblos, im nächsten Augenblick beim Schütteln wurde sie stark blau. Entfärbt wurde mit neuerlich zugesetzten 0,8 ccm Thiosulfat. Für die Folge wurde im Tageslicht stehen gelassen.

24 Minuten nach der Titration wurde zur Entfärbung 1,00 ccm Thiosulfat zugelassen. Nach 10 Minuten zeigte sich noch keine Nachbläuung. Aber sofort auf Umschütteln.

Entfärbung trat durch 1,5 ccm Natriumthiosulfat ein.

3 Stunden nach 1. Titration wurde mit 2,00 ccm,
4,5 „ „ 1. „ „ „ 1,00 ccm
Thiosulfat entfärbt.

Nach 5 tagelangem Stehen im dunkeln wurde mit 0,40 ccm Thiosulfat entfärbt; 6×24 Stunden nach der 1. Titration trat keine Nachbläuung mehr ein, auch beim schütteln nicht. Nach zweistündigem Stehen im Lichte zeigte sich schwache Bläuung. Der Versuch wurde hier abgebrochen. Im ganzen wurden nach Zulassen der ersten 6,3 ccm zur Entfärbung der wiederkehrenden Bläuung 8,8 ccm Thiosulfat verbraucht.

Diese Nachbläuung an sich und das Maß der zu ihrer Entfärbung nötigen ccm Natriumthiosulfat zeigen, daß ein Teil des im Laufe der Zeit gebundenen Broms leicht abspaltbar, also wahrscheinlich addiert ist.

Was aus dem Rest des umgesetzten Broms geworden ist, der sich mit Natriumthiosulfat nicht zurücktitrieren läßt, geht aus den Versuchen nicht hervor, wenn man nicht annimmt, daß durch Ammonchloridbildung, Substitution oder Oxydation im Molekül der Aminosäuren Reduktion von Brom eingetreten ist.

Da in den Fällen, wo starke Nachbläuung eintritt, der Punkt nicht sicher ist, der als Umschlag zu gelten hat, so läßt sich auch kein Quotient berechnen. In der Folge wurde daher von Bestimmungen längerer Bromeinwirkung abgesehen.

Bei Bromeinwirkung von $^1/_4$ Stunde zeigen die untersuchten Aminosäuren ohne Ring keine nennenswerten Veränderungen, welche sich durch Abnahme von freiem Brom bemerkbar machen.

Bei längerer Bromierung nimmt der Bromverbrauch mit der Zeit in allen Fällen zu.

Da die freie Brommenge bei allen Untersuchungen in sehr großem Überschuß angewendet wurde, ist ihre Abnahme durch Umsetzung verhältnismäßig so gering, daß die doppelte Menge freies Brom angewandt, keinen Einfluß auf den Bromverbrauch hat.

Tabelle der Dauerversuche.

Nr.	Substanz	Zeit der Bromeinwirkung in Stunden	Quotient	Bemerkung
29	Glykokoll	36	·/.	
30	Alanin	2	16,62	(21,47) korrig. Quotient
31		12	9,61	(13,76) „ „
32		24	5,81	(6,85) „ „
33		13×24	3,34	(3,72) „ „
34	Alanin + Glykokoll	23	21,05	
35		40	19,04	
36		3×24	10,52	
37		6×24	10,00	
38		11×24	7,24	
39		17×24	6,55	
40		40×24	5,60	
41		154×24	4,16	
42		154×24	4,12	
43	Asparaginsäure	10	6,69	
44		12	6,15	
45		72	3,31	
46		13×24	1,61	
47		31×24		
48		31×24		nach 31 Tagen kein freies Brom mehr vorhanden.
49		31×24		
50	7 5 ccm Bromidbromatlösung	31×24		
51		31×24		
52		104×24	0,72	
53		104×24	0,87	
54		104×24	0,70	
55		104×24	0,72	
56	umkristallisiert	104×24	0,80	
57		104×24	0,74	
58		104×24	0,57	100 ccm Bromidbromatlösung
59		104×24	0,74	
60		104×24	0,71	
61	Glutaminsäure	4×24	2,74	
62		8×24	2,25	
63		10×24	2,10	
64		31×24		Nach 14 Tagen kein freies Brom mehr vorhanden.
65		31×24		
66		31×24		
67		112×24	0,56	
68		112×24	0,58	
69		112×24	0,60	
70		123×24	0,44	
71		123×24	0,59	100 ccm Bromidbromatlösung
72		123×24	0,40	
73	Asparagin	5×24	—	Starke Nachbläuung, deshalb kein Quotient zu bestimmen möglich
74		11×24	—	
75		25×24	—	
76		130×24	—	

Starke Nachbläuung nach der Entfärbung deutet darauf hin, daß ein Teil des Broms durch Addition sehr locker gebunden ist.

Bei Asparagin scheint im Laufe der Zeit die Amidgruppe einen starken Einfluß auf Brom durch lockere Bindung auszuüben, die sich durch starke Nachbläuung zu erkennen gab, welche bei Asparaginsäure bei fast gleicher Dauer der Bromeinwirkung nicht beobachtet wurde.

---

3. Untersuchung von Aminosäuren mit ringförmigem Komplex.

Mit Phenolkern: Phenylalanin, Phenylglykokoll, Tyrosin: p-Oxyphenyl α-aminopropionsäure; mit anderem ringförmigen Kern, mehr als 1 Atom N enthaltend: Trytophan: Indol α-aminopropionsäure, Histidin: α-amino-β-imidazolpropionsäure.

Bei diesen Aminosäuren war mit einer erheblichen Bromumsetzung zu rechnen. Für Tyrosin,[1]) Tryptophan[2]) und Histidin[3]) ist Substitutionsmöglichkeit von Halogen nachgewiesen. Die Halogensubstitution wird unter besonderen Vorsichtsmaßregeln vorgenommen, um möglichst quantitative Ausbeuten zu erhalten. So setzten die erwähnten Autoren das Halogen allmählich in dem Maße zu, als es gebunden wurde unter Anwesenheit von Alkalikarbonat, -bikarbonat, oder -hydroxyd zur Abstumpfung der reaktionshemmenden Halogenwasserstoffsäuren, die sich durch Halogenreduktion bilden. Außerdem wird auf die Temperatur Rücksicht genommen. So erhält A. Oswald[4]) durch Jodieren von Tyrosin erst bei 0° quantitative Ausbeute, die Wheeler und Jamieson[1]) bei gewöhnlicher Temperatur nicht gelungen war.

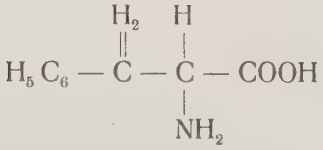
---

[1]) Wheeler u. Jamieson, J. Am. Chem. Soc. **33**, 325 (1905).
[2]) Neuberg u. Popowski, Bioch. Ztschr. **2**, 357 (1906).
[3]) H. Pauly, Berl. Ber. **43**, 2243 (1910).
[4]) Z. physiol. Chem. **59**, 320 (1909).

Bei meinen Bestimmungen kam es nicht darauf an, maximale Bromumsetzung zu erhalten, sondern zu prüfen, ob unter gleichen, stets ausführbaren Bedingungen von den Aminosäuren gleiche Brommengen umgesetzt werden.

a) Zeit der Bromeinwirkung $^1/_4$ Stunde.

Phenylalanin. Phenyl-α-aminopropionsäure.
Mol. Gew. 165,09.

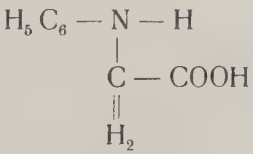


Da vorher gemachte Bestimmungen mit Phenylalanin von Kahlbaum auffallend hohe Bromumsetzung zeigten, wurden mit einer frischen Sendung derselben Firma nach Umkristallisieren aus heißem Wasser die folgenden Bestimmungen ausgeführt. Der Stopfen wurde vor dem Jodkaliumzusatz nicht gelüftet.

77. 0,0478 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,00
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 29,80 ccm
umgesetztes Brom 0,20 ccm
Quotient = ∞

78. 0,0482 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,00
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 29,78 ccm
umgesetztes Brom 0,22 ccm
Quotient = ∞

Phenylglykokoll. Phenyl-α-aminoessigsäure.
Mol. Gew. 151,07.



Auf Zusatz der Bromidbromatlösung und Salzsäure schied die gelbliche Lösung eine weiße Trübung ab, die sich im Verlauf der Viertelstunde zu einer weißen Fällung verstärkte. Es wurde in dieser Zeit öfter geschüttelt und nach dem Jodkaliumzusatz 10 Minuten mit dem Zurücktitrieren gewartet. Bei Zusatz des Jodkaliums wurde bei Bestimmung 79 bis 82 der Stopfen gelüftet.

79. 0,1034 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,15
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 1,60 ccm
umgesetztes Brom 28,55 ccm
Quotient = 0,24.

Das von Kahlbaum bezogene Präparat war ein braunes, stark hygroskopisches Pulver, anscheinend zersetzt. Um es zu reinigen, versuchte ich es aus heißem, absoluten Alkohol umzukristallisieren und bekam bei dem Versuch mit einer kleinen Menge nach ganz langsamem Verdunsten aus dem Reagensglas bei Zimmertemperatur eine Kristallisation weißer Nadeln. Die Verarbeitung größerer Mengen scheiterte an der Bildung brauner, zäher Massen beim Erhitzen auf dem Wasserbade und beim Stehen an der Luft. Daher wurde der Alkohol verjagt und im Soxhletapparat 4 tägige Extraktion mit Äther versucht. Nach Verdunsten des Äthers und Trocknen im Exsikkator blieb eine zitronengelbe, körnige Masse zurück. Diese wurde verarbeitet.

80. 0,0881 g in kaltem Wasser gelöst und 50 ccm Bromidbromatlösung (Titer 29,8) gaben auf Zusatz von 5 ccm Salzsäure weder Bromfarbe noch Fällung. Deshalb gab ich sofort weitere 50 ccm Bromidbromatlösung und 5 ccm Salzsäure zu. Jetzt trat Gelbfärbung durch freies Brom auf und Abscheidung einer weißen, molkigen Fällung.

Es wurde weiter verfahren wie bei 79, nur 20 ccm Jodkaliumlösung zugesetzt.

0,0881 g. 100 ccm Bromidbromatlösung, (Titer 29,8)
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 20,42 ccm
umgesetztes Brom 39,18 ccm
Quotient = 0,15.

Zu den beiden folgenden Bestimmungen wurden 5 g von Kahlbaum bezogenes Phenylglykokoll direkt mit Äther im Soxhletapparat ausgezogen. Der Rückstand nach Verdunsten des Äthers und Trocknen im Exsikkator war eine sehr harte, weißliche, nicht hygroskopische Masse, die sich in kaltem Wasser sehr schwer löste.

81. 0,4039 g. 200 ccm Bromidbromatlösung (Titer 29,8) + 20 ccm Salzsäure. Jodkaliumzusatz 40 ccm.
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 2,00 ccm
umgesetztes Brom 117,20 ccm
Quotient = 0,23.

Es trat Nachbläuung auf, die nach 5 Min. mit 0,4 ccm, nach 24 Stunden wieder aufgetreten, mit 0,3 ccm Natriumthiosulfat entfärbt wurde. Nach weiteren 24 Stunden war abermals schwache Bläuung vorhanden.

Der Umschlag erfolgte nicht in Farblos, sondern es blieb stets ein auch durch etwas größeren Überschuß von Thiosulfat nicht zu beseitigender, violetter Schein.

82. 0,0716 g, 50 ccm Bromidbromatlösung (Titer 29,8) + 5 ccm HCl gab nach 10 Minuten wasserfarbene Lösung mit schwacher weißlicher Trübung. Deshalb Zusatz von weiteren 50 ccm Bromidbromatlösung (Titer 29,8) + 5 ccm HCl und Warten weiterer 15 Minuten. Jodkaliumlösung wurden 20 ccm zugesetzt.

Zurücktitriert. Natriumthiosulfat 25,80 ccm
umgesetztes Brom 33,80 „
Quotient = 0,14.

Da alle diese Bestimmungen des Phenylglykokolls wegen der zweifelhaften Beschaffenheit des Präparates nicht einwandfrei erschienen, stellte ich die Aminosäure frisch dar und bestimmte die Bromumsetzung nochmals ohne Lüften des Stopfens vor Zusatz des Jodkaliums.

25 g frisch destilliertes Anilin, 25 g Monochloressigsäure, 40 g Natriumacetat und 3 ccm Wasser wurden 40 Minuten auf dem Wasserbade gehalten und darauf Wasser bis zur

milchigen Trübung zugegeben. Nach sorgfältigem Absaugen der Lösung wurden die Kristalle in Ammonkarbonatlösung gelöst, diese Lösung mit Salzsäure angesäuert und zur Entfernung der Phenyliminoessigsäure wiederholt mit Äther ausgeschüttelt. Die erst stark gelbe Farbe der Lösung ging dabei in weingelb über. Die saure Lösung mit NH_3 neutralisiert und konzentriert, gab eine Abscheidung von reinweißen Kristallmassen, die abgesaugt und über H_2SO_4 getrocknet wurden.

Dieses Produkt zeigte noch Brombindung, wenn auch weniger als das von Kahlbaum bezogene Präparat. Bei Einwirkung des Broms zeigte sich eine schwach rosa gefärbte Fällung, der Umschlag erfolgte in rosaviolett.

Zur Reinigung wurde nochmals aus heißem Wasser umkristallisiert, getrocknet und dann bromiert.

0,4334 g Phenylglykokoll, wurden in Wasser (sehr leicht) gelöst, auf 50 ccm gebracht und davon je 10 ccm zur Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl verwendet. Der N-gehalt entsprach 5,95 ccm $NaOH \frac{n}{10}$.

N berechnet 9,27 %
N gefunden 9,61 %.

Je 10 ccm, also 0,08668 g, wurden zur Bestimmung ihres Bromverbrauchs verarbeitet.

Je 50 ccm Bromidbromatlösung (Titer 30,00) und die Salzsäure zugefügt gaben keine Fällung, sondern nur starke Bromfärbung. Der Stopfen wurde bei dem Zusatz des Jodkaliums nicht gelüftet.

Zurücktitrierte Natriumthiosulfatlösung

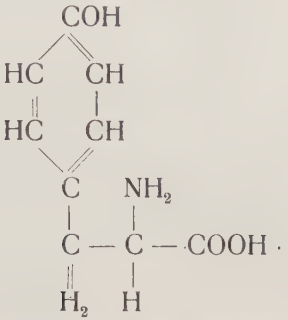
83. 29,95 ccm
84. 29,98 ccm } Quotient = ∞

Nach Eintreten des Umschlages war die Flüssigkeit vollkommen farblos.

Aus diesen Bestimmungen geht sehr deutlich hervor, wie für das Brombindungsvermögen die Beschaffenheit der zu untersuchenden Substanz maßgebend ist, und daß umgekehrt dieses Brombindungsvermögen zur Kontrolle auf Rein-

heit herangezogen werden könnte. (S. auch Asparaginsäure und Phenylalanin).

Tyrosin. p-Oxyphenyl-α-aminopropionsäure.
Mol. Gew. 181,09.



5 g nach bekannten Methoden aus Kasein durch Spaltung mit Zinnchlorür und Salzsäure gewonnenes Tyrosin wurden aus heißem Wasser wiederholt, zuletzt mit etwas Tierkohle umkristallisiert, über Schwefelsäure getrocknet und der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt.

1. in 0,1509 g Tyrosin entsprachen dem N-gehalt 8,08 ccm $\frac{n}{10}$ Natronlauge
2. in 0,1319 g Tyrosin entsprachen dem N-gehalt 7,14 ccm $\frac{n}{10}$ Natronlauge

Demnach

1. Stickstoffgehalt gefunden 7,50 % } berechnet 7,74 %.
2. „ „ 7,60 % }

Es lag also reines Tyrosin vor.

0,5127 g Tyrosin wurden mit Hilfe weniger Tropfen Salzsäure in Wasser gelöst und die Lösung auf 250 ccm gebracht. Bei Bestimmung 85 und 86 wurde der Stopfen vor dem Jodkaliumzusatz gelüftet.

Von der Lösung wurden 15 ccm verwendet, zu 85 also 85. 0,03076 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 29,80

zurücktitriert. Natriumthiosulfat	21,80 ccm
umgesetztes Brom	8,00 ccm

Quotient = 0,21.

Zur Bestimmung 86 wurden 25 ccm verwendet, also 0,05127 g, 100 ccm Bromidbromatlösung (Titer 29,80), 10 ccm Salzsäure und 20 ccm Jodkaliumlösung.

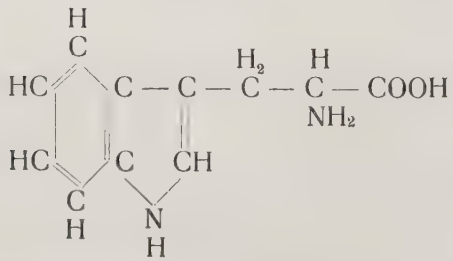
86. Zurücktitriert. Natriumthiosulfat 46,10 ccm
umgesetztes Brom 13,50 „
Quotient = 0,21.

Der Stopfen wurde bei Bestimmung 87 und 88 vor dem Jodkaliumzusatz nicht gelüftet.

87. 0,0539 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,00
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 16,98 ccm
umgesetztes Brom 13,02 ccm
Quotient = 0,23.

88. 0,0542 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,00
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 16,57 ccm
umgesetztes Brom 13,43 ccm
Quotient = 0,22.

Tryptophan. Indol-α-aminopropionsäure. Mol. Gew. 204,12.



Für meine Bestimmungen stellte ich mir diese Aminosäure selbst her nach Hopkins und Cole[1]) aus Kasein. Das Kasein wurde 3 Wochen mit Trypsin verdaut, das Reaktionsgemisch auf 80° erhitzt und filtriert. Zu dem klaren Filtrat wurden 5 Vol.-Prozente H_2SO_4 conc. zugegeben und nach einigen Stunden filtriert. Darauf wurde mit Merkurisulfat gefällt, nach 12stündigem Stehen filtriert und mit 5%iger Schwefelsäure gewaschen. Im Niederschlag wurde das Quecksilber durch

[1]) Journ. of Physiol. **27**, 418 (1901); **29**, 451 (1903).

Schwefelwasserstoff entfernt, der Schwefelwasserstoff durch Kochen.

2. Fällung: Die auf 5 Vol.-Prozente Schwefelsäure gebrachte Flüssigkeit, mit Merkurisulfat versetzt, bis eine geringe Fällung entstand (Cystin), wurde filtriert, darauf wieder mit Merkurisulfat vollkommen gefällt und wie bei der ersten Fällung weiter behandelt.

Die resultierende Lösung wurde mit Bariumhydroxyd von Schwefelsäure befreit und dieses mit Schwefelsäure quantitativ entfernt. Die Lösung wurde unter Alkoholzusatz eingedampft, bis nach dem Entfernen vom Wasserbad ein Kristallbrei entstand, die Kristalle abgesaugt und wiederholt aus Wasser und Alkohol umkristallisiert.

Bei dem Umkristallisieren aus heißem Wasser unter Zusatz von Alkohol war eine Bräunung der Lösung und Ansetzen brauner Ränder trotz aller Sorgfalt nicht zu vermeiden. Demnach wirkt kochend heißes Wasser zersetzend auf Tryptophan, worauf auch schon Krukenberg[1]) hinweist, ebenso Hopkins und Cole, im Gegensatz zu anderen Autoren.

Das Präparat zeigte sich auskristallisiert als weiße, stark glänzende, sehr leichte Schuppen.

Die Glyoxyl- und Bromwasserreaktion waren positiv, (Stickstoffbestimmung s. später).

Titriert wurde ohne Lüften des Stopfens vor Zusatz des Jodkaliums.

89. 0,0547 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,00
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 9,25 ccm
umgesetztes Brom 20,75 ccm
Quotient = 0,25.

90. 0,0600 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,00
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 8,20 ccm
umgesetztes Brom 21,80 ccm
Quotient = 0,27.

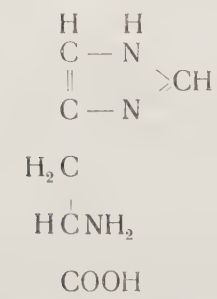
Obwohl Neuberg und Popowski[2]) erwähnen, daß Halogensubstitutionsprodukte des Tryptophans ihren Stickstoff

[1]) Verhandl. d. physik. med. Gesellsch. zu Würzburg **18**, 179 (1884).
[2]) Biochem. Ztschr. **2**, 357 (1906).

nach Kjeldahl nicht bestimmen lassen, unterwarf ich doch die Reaktionsgemische von Bestimmung 89 und 90 der Kjeldahlbestimmung, indem ich jedes der Gemische quantitativ in einen Kjeldahlkolben spülte, eindampfte und wie üblich unter Zusatz von Kaliumsulfat und Kaliumpermanganat verbrannte usw. Die beiden oben genannten Autoren finden für ihr nicht gebromtes, nach Hopkins und Cole hergestelltes Tryptophan 13,3% N nach Kjeldahl bestimmt, berechnet 13,73%.

Ich fand 13,33% N.

Histidin. α-amino-β-imidazolpropionsäure,
Mol. Gew. 155,10,



hergestellt aus Blut durch Spaltung mit Salzsäure. Die Substanz wurde bis zur Gewichtskonstanz über Schwefelsäure getrocknet. Der Stopfen wurde bei Zusatz des Jodkaliums gelüftet.

91. 0,2126 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 29,98.
Nach 10 Minuten war die Mischung wasserhell;
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 0,35 ccm
umgesetztes Brom 29,63 ccm
Quotient = 1,39.

92. 0,1029 g. 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 29,98
zurücktitriert. Natriumthiosulfat 14,15 ccm
umgesetztes Brom 15,83 ccm
Quotient = 1,26.

Bei Bestimmung 91 zeigte sich nach den ersten 10 Minuten Entfärbung der gelben Flüssigkeit, d. h. es war alles freie Brom

gebunden. Auf Jodkaliumzusatz erfolgte Jodabspaltung, demnach auch Abspaltung von locker gebundenem Brom. Da bei Bestimmung 92 verhältnismäßig doppelt so viel freies Brom angewandt wurde als bei 91, mag sich hier der etwas geringere Bromverbrauch erklären.

Zusammenstellung der Bestimmungen der Aminosäuren mit Ringkomplex. Dauer der Bromeinwirkung $^1/_4$ Stunde.

Bestimmung	Substanz	Quotient
77*	Phenylalanin	∞
78*	„	∞
79	Phenylglykokoll	0,24
80	„	0,15
81	„	0,23
82	„	0,14
83*	„	∞
84*	„	∞
85	Tyrosin	0,21
86	„	0,21
87*	„	0,23
88*	„	0,22
89*	Tryptophan	0,25
90*	„	0,27
91	Histidin	1,38
92	„	1,26

Im Tyrosin entfallen also auf 1 Atom Stickstoff fast 5 Atome Brom. Die Hälfte davon muß in Bromwasserstoff übergegangen sein, wenn die andere substituierend auf das Tyrosin gewirkt hat. 1 Mol. Tyrosin vermag 2 Atome Brom durch Substitution zu binden. Demnach zeigt sich bei meinen Bestimmungen ein etwas zu hoher Bromverbrauch, der durch

Anmerkung. Die mit * bezeichneten Bestimmungen wurden ohne Lüften des Stopfens vor Zusatz der Jodkaliumlösung ausgeführt.

den starken Bromüberschuß in salzsaurer Lösung verursacht werden dürfte. Alle 4 Bestimmungen zeigen gut übereinstimmende Quotienten.

Ein Molekül (also 3 Atome N) Histidin setzt etwas mehr als 2 (genau 2,16 und 2,38) Atome Brom um, wovon die Hälfte reduziert sein muß, wenn die andere substituierend gewirkt haben sollte. Nach Pauly[1]) setzt Histidin 2 Atome Brom um. (Das Halogensubstitutionsprodukt konnte er isoliert nicht darstellen).

Phenylalanin zeigt entsprechend den schon erwähnten Untersuchungen A. Oswalds[2]) keine Umsetzung mit Brom.

Tryptophan wurde von Neuberg und Popowski[3]) bromiert und je nach Art der Bromierung zwei durch Bromgehalt verschiedene Reaktionsprodukte erhalten, nämlich ein rotes, ein Atom, und ein gelbes, 3 Atome Brom enthaltend. Nach meinen Bestimmungen entfallen auf 1 Mol. Tryptophan 7,74 resp. 7,41 Atome umgesetztes Brom, wovon die eine Hälfte substituierend gewirkt haben könnte, während die andere reduziert ist. Also auch hier höherer Bromverbrauch als zu erwarten war. Jedoch ist der Quotient bei den verschiedenen Aminosäuren konstant.

b) Zeit der Bromeinwirkung auf Tyrosin länger als $^1/_4$ Stunde.

Der Stopfen wurde vor Zusatz des Jodkaliums gelüftet.

Tyrosin, dasselbe Material wie bei Bestimmung 85 u. 86.

0,5127 g Tyrosin wurden mit Hilfe weniger Tropfen Salzsäure in kaltem Wasser gelöst und auf 250 ccm gebracht. Davon wurden zu den folgenden Proben je 25 ccm verwendet, also 0,05127 g, 100 ccm Bromidbromatlösung zugefügt (Titer 29,80), 10 ccm Salzsäure und 20 ccm Jodkaliumlösung.

---

[1]) Berl. Ber. **43**, 2243 (1910).
[2]) Z. physiol. Chem. **58**, 290 (1908).
[3]) Biochem. Ztschr. **2**, 357 (1906).

Bestimmung	Stunden der Bromeinwirkung	Zurücktitriertes Natriumthiosulfat $\frac{n}{10}$ ccm	Dem umgesetzten Brom entsprechende ccm $\frac{n}{10}$ Bromlösung	Quotient
93	2×24	29,28	30,32	0,09
94	4×24	26,54	33,06	0,09
95	6×24	25,30	34,30	0,08
96	8×24	23,20	36,40	0,08
97	12×24	20,30	39,30	0,07
98	14×24	19,10	40,50	0,07
99	18×24	17,65	41,95	0,07
100	103×24	10,15	49,45	0,06

Bei allen Bestimmungen trat schwache Nachbläuung ein. Der Quotient fällt stetig mit der Zeit durch entsprechend zunehmenden Bromverbrauch. Dieses Brom ist nicht so locker an das Molekul gebunden wie bei Glutaminsäure und besonders Asparagin.

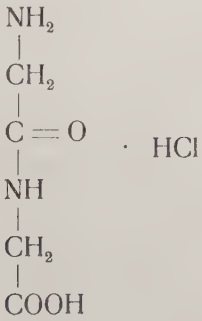
---

4. Untersuchung von salzsaurem Glycylglycin, ein Peptid.

Es wurde zur Bestimmung frisch dargestellt.

Vor dem Zusetzen des Jodkaliums wurde der Stopfen nicht gelüftet.

0,0998 g salzsaures Glycylglycin,



frisch dargestellt weiße verfilzte Nadeln, wurden $^1/_4$ Stunde bromiert.

Zugesetzte Bromidbromatlösung 50 ccm,	Titer 30,00	
zurücktitriertes Natriumthiosulfat		30 ccm
umgesetztes $\frac{n}{10}$ Brom		0 ccm

Quotient $= \infty$

Es tritt also keine Umsetzung von Brom ein.

III. Untersuchung von Eiweißkörpern und Eiweißspaltstücken.

Aus den bis jetzt aufgeführten Bestimmungen geht hervor, daß nur Aminosäuren mit Ringkomplex für die Bromumsetzung in Frage kommen und unter diesen nur Tyrosin, Tryptophan und Histidin.

Nach Untersuchung der isolierten Aminosäuren wurden die gekuppelten Aminosäuren in ihrem Verhalten zu Brom geprüft, um zu sehen, welchen Einfluß die Bindung der einzelnen Säuren zu größeren oder kleineren Komplexen zeigen würde.

Der Bromverbrauch kann bei den Proteinkörpern 1. gleich, 2. geringer, 3. höher sein als bei der Summe der Spaltstücke.

Ich stellte zuerst Untersuchungen mit Gelatine an.

Da die Gelatine des Handels je nach ihrer Herstellung aus den Fabriken in wechselnder Zusammensetzung hervorgeht, bezog ich eine für alle Bestimmungen ausreichende Menge Gelatine, schnitt sie in quadratzentimetergroße Stückchen und mischte diese gut, um ein homogenes Ausgangsmaterial zu erhalten. Um das Trocknen und die damit verbundene Gefahr der Veränderung des Ausgangsmaterials zu umgehen, wurde in den zur Untersuchung hergestellten Lösungen der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt und dadurch die Möglichkeit zu Vergleichungen gegeben. Da das Gelatinieren ungefähr 10% iger Lösungen in Wasser bei gewöhnlicher Temperatur Abmessen mit Pipetten ausschließt, wurden alle Lösungen, die wegen ihrer Konzentration noch erstarrten, bei 33° C gemessen. Es wurde etwas höher erhitzt und dann auf 33° abgekühlt. Umgekehrt waren schwer Lösungen bei 33° zu erhalten. Verdünnte, oder nach der Spaltung nicht gelatinierende Lösungen wurden bei gewöhnlicher Temperatur abgemessen. Jedenfalls

wurde immer darauf geachtet, keine prinzipiellen Fehler durch Wechsel der Temperatur zu erhalten.

Die Gelatinelösung ließ sich ohne Schwierigkeit bromieren, zeigte weder Gelatinierung noch Fällung bei der Bromeinwirkung. Sobald aber die Jodkaliumlösung zufloß, gab es Trübung und sofort Bildung schwarzer, zäher und schmieriger Klumpen, die an den Glaswandungen fest klebten und unter keinen Umständen der Einwirkung der Natriumthiosulfatlösung zugänglich waren.

Da nun gerade auf die Gelatinebestimmungen wegen des Fehlens von Tyrosin und Tryptophan nicht verzichtet werden konnte, versuchte ich die Klumpenbildung zu verhindern erst durch Zusatz von angeschütteltem Fliespapier vor Zusatz der Salzsäure. Dadurch wurde zwar die Klumpenbildung vollkommen vereitelt, aber ein neuer Übelstand war, wie zu erwarten gewesen, durch das Brombindungsvermögen der Zellulose gegeben. Wenn sich auch diese Brombindungsfähigkeit bestimmen läßt, so blieb die Anwendung bestimmter Mengen Filtrierpapier doch unbequem.

Deshalb versuchte ich Asbest zu verwenden. Trotz sorgfältigster Reinigung verbrauchte Asbest auch Brom und unterschied sich so durch nichts vom Filtrierpapier.

Nicht ganz von gleicher Fähigkeit, Klumpenbildung zu verhindern, vermöge geringerer Porosität, aber doch außerordentlich bequem zu handhaben, erwies sich endlich das Talkumpulver, vor allem ohne das geringste Brombindungsvermögen.

Es wurden bei Ausführung der Bestimmung vor dem Salzsäurezusatz ein oder zwei Teelöffel, je nach Menge der Flüssigkeit zugesetzt, kräftig geschüttelt, die Jodkaliumlösung dann vorsichtig ohne Schütteln zugelassen und nun mit einem schnellen Ruck und folgendem kräftigen Schütteln eine vollkommen homogene Masse erhalten. Zeigten sich nach dem Zurücktitrieren und Absetzenlassen am Boden der Flasche doch mitunter kleine Klümpchen, so wurde stets bei wiederholter Bestimmung vollkommene Umsetzung erreicht.

Alle von jetzt ab folgenden Titrationen wurden ohne Lüften des Stopfens vor Zusatz des Jodkaliums ausgeführt.

Die Quotienten ergeben sich, indem von je 2 Stickstoffbestimmungen zur Berechnung das Mittel genommen wird, die Stickstoff- und Bromwerte auf gleiche Mengen Gelatine umgerechnet und die Kubikzentimeter $\frac{n}{10}$ Stickstofflösung durch die Kubikzentimeter $\frac{n}{10}$ Bromlösung dividiert werden.

a) Bestimmung der Quotienten der Gelatine und ihrer unter verschiedenen Bedingungen erhaltenen Spaltungsprodukte.

1. Gelatine gelöst in Wasser.

25 g Gelatine wurden mit etwas weniger als 250 ccm Wasser auf dem Wasserbade gelöst, nach dem Abkühlen auf 33° C auf 250 ccm gebracht (Urlösung) und davon 15 ccm von 33° C zu der schon in den Flaschen befindlichen Bromidbromatlösung pipettiert. Die Pipetten waren auf 33° C angewärmt. Treten jetzt Klumpen auf, müssen diese durch vorsichtiges Anwärmen auf dem Wasserbad vor der Titration erst gelöst werden.

10 ccm der Urlösung von 33° C brachte ich mit Wasser auf 50 ccm von Zimmertemperatur und verwendete davon je 5 ccm zur Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl, also 1 ccm Urlösung.

15 ccm Urlösung wurden unter Zusatz von Talkumpulver bromiert. 50 ccm Bromidbromatlösung (Titer 30,00).

Nr.	Zurücktitrierte ccm Natriumthiosulfat $\frac{n}{10}$	Umgesetztes Brom in ccm $\frac{n}{10}$ Bromlösung
1	21,00	9,00
2	21,00	9,00
3	21,10	8,90
4	20,90	9,10
5	21,05	8,95
6	21,00	9,00

Dem in 1 ccm Urlösung enthaltenen Stickstoff entsprechende $\frac{n}{10}$ Na OH waren 1. 9,5 2. 9,5 ccm.

Der Stickstoffgehalt für 15 ccm Urlösung ist $9{,}5 \cdot 15 = 142{,}5$ ccm $\frac{n}{10}$ Stickstoff und ist durch die gefundenen ccm Brom $\frac{n}{10}$ zu dividieren, um zu den Quotienten zu gelangen.

Quotienten	1.	15,84	Quotienten	4.	15,66
„	2.	15,84	„	5.	15,92
„	3.	16,01	„	6.	15,84

Demnach ist die größte Differenz der Quotienten der einzelnen Bestimmungen 0,35, entsprechend einer Differenz von 0,2 ccm zurücktitrierter $\frac{n}{10}$ Natriumthiosulfatlösung, ein Fehler, der die Fehlergrenze der Methode nicht überschreiten dürfte.

Durchschnittlicher Quotient: 15,85.

Durch die folgenden Bestimmungen der Brombindung nach Spaltung mit verschiedenen und verschieden starken Säuren sollte ermittelt werden, ob mit dem Abbau des größeren Moleküles in kleinere Spaltstücke ein Zurückgehen der Bromumsetzung verknüpft sei, und welchen Einfluß die Spaltung unter verschiedenen Bedingungen zeigt.

2. Spaltungsmittel 12,5%ige Salzsäure.

20 g Gelatine wurden in 200 ccm 12,5%iger Salzsäure gelöst und 10 Stunden am Rückflußkühler gekocht.

Von dieser Urlösung wurden je 15 ccm, abgemessen bei Zimmertemperatur, der Brombestimmung unterworfen, die überschüssige Salzsäure genau mit Natronlauge (hergestellt aus Natriumhydroxyd, mit Alkohol gereinigt) neutralisiert, darauf 50 ccm (Titer 30,00) Bromidbromatlösung zugegeben und in üblicher Weise weiter verfahren. Die ersten Bestimmungen scheiterten daran, daß auf Jodkaliumzusatz Klumpenbildung auftrat, obwohl die Lösung nach dem Spalten nicht

mehr gelatiniert hatte. Es mußten deshalb die Bestimmungen unter Zusatz von Talkum wiederholt werden.

15 ccm Lösung wurden bromiert.

Zurücktitrierte ccm Natriumthiosulfat 1. 22,54 2. 22,52

Umgesetzte ccm $\frac{n}{10}$ Bromlösung 1. 7,46 2. 7,48.

Der in 2 ccm Lösung enthaltene Stickstoff entspricht 1. 20,05 2. 20,10 ccm $\frac{n}{10}$ NaOH. Der Stickstoffgehalt für 15 ccm ist demnach 20,075 · 7,5 ccm $\frac{n}{10}$ N-Lösung und diese sind durch die dem umgesetzten Brom entsprechenden ccm $\frac{n}{10}$ Bromlösung zu dividieren.

Dann sind die Quotienten 1. 20,18 2. 20,13.

3. Spaltungsmittel 12,5%ige Salzsäure, 1,5 g Zinnchlorür in 100 ccm gelöst enthaltend.

Gelöst wurden 20 g Gelatine mit soviel 12,5%iger Salzsäure, in der das Zinnchlorür sich schon gelöst befand, daß das Gesamtvolum 200 ccm betrug. Nach dem Kochen wurde auf 2 Liter mit Wasser verdünnt und das Zinn als schwarzer Niederschlag, also hauptsächlich als Sulfur, mit Schwefelwasserstoff vollkommen ausgefällt (Prüfung des noch weiter verdünnten Filtrates auf vollkommene Fällung). Darauf wurde auf dem Wasserbad zur Sirupdicke eingedampft; mit Wasser gelöst und auf 200 ccm gebracht, ergab sich eine klare Lösung, die wie alle mit Zinnchlorür reduzierten Lösungen hellere Farbe zeigte als die ohne Zinnchlorür behandelten. Von dieser wurden je 15 ccm zur Brombestimmung verwendet.

Unter Talkumpulverzusatz:

50 ccm Bromidbromatlösung	Titer 30,00	
zurücktitriert. Natriumthiosulfat	23,08	23,04 ccm
umgesetztes $\frac{n}{10}$ Brom	6,92	6,96 ccm

Zur Kjeldahlbestimmung wurden 10 ccm Urlösung auf 200 ccm mit Wasser verdünnt und davon 20 ccm verarbeitet,

also 1 ccm Urlösung, deren Stickstoffgehalt 1. 10,10; 2. 10,05 ccm Na OH $\frac{n}{10}$ entsprach.

Der Stickstoffgehalt ist für 15 ccm Urlösung im Mittel 10,075 · 15 ccm $\frac{n}{10}$ N-lösung

Demnach sind die Quotienten: 1. 21,84; 2. 21,71.

4. Spaltungsmittel 25%ige Salzsäure.

25 g Gelatine wurden in 250 ccm 25%iger Salzsäure gelöst und 10 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Von dieser Urlösung wurden je 15 ccm unter Talkumpulverzusatz bromiert nach Neutralisation mit Na OH.

15 ccm Urlösung, 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,00		
zurücktitriert. Natriumthiosulfat	21,8	21,73 ccm
umgesetztes Brom	8,2	8,27 ccm

Zur Kjeldahlbestimmung wurden je 5 ccm Urlösung mit Wasser auf 100 ccm verdünnt und davon je 20 ccm verarbeitet, also 1 ccm Urlösung, deren Stickstoffgehalt 1. 10,70; 2. 10,60 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH entsprach.

Der Stickstoffgehalt ist im Mittel für 15 ccm Urlösung gleich 10,65 · 15 ccm $\frac{n}{10}$ N-lösung.

Demnach sind die Quotienten: 1. 19,94; 2. 19,32.

5. Spaltungsmittel 25%ige Salzsäure, 1,5 g Zinnchlorür in 100 ccm gelöst enthaltend.

25 g Gelatine wurden mit 25%iger, auf 100 ccm 1,5 g Zinnchlorür enthaltender Salzsäure gelöst, nach dem Kochen wie bei 3. mit H_2S behandelt, aber eine braune Fällung von Zinnsulfid erhalten, also ein Zeichen, daß alles Zinnchlorür oxydiert worden war.

Je 15 ccm Urlösung wurden zur Brombestimmung verwendet unter Zusatz von Talkumpulver.

		Titer 30,00
50 ccm Bromidbromatlösung, zurücktitriert. Natriumthiosulfat	24,25	24,00 ccm
umgesetztes Brom	5,75	6,00 ccm

Zur Kjeldahlbestimmung wurden 20 ccm Urlösung mit Wasser auf 200 ccm gebracht und davon je 10 ccm verarbeitet, also 1 ccm Urlösung, deren Stickstoffgehalt 1. 8,02; 2. 8,05 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH entsprach.

Der Stickstoffgehalt ist für 15 ccm Urlösung im Mittel 8,036 · 15 ccm $\frac{n}{10}$ N-lösung.

Demnach sind die Quotienten: 1. 20,96; 2. 20,09.

6. Spaltungsmittel 25%ige Salzsäure, 3 g Zinnchlorür in 100 ccm gelöst enthaltend.

Gespalten wurde durch Kochen wie bei 5), aber Zinnchlorür im Überschuß zugesetzt. Die Schwefelwasserstoffällung war schwarz. Je 15 ccm Urlösung wurden zur Brombestimmung verwendet.

		Titer 30,00
50 ccm Bromidbromatlösung, zurücktitriert. Natriumthiosulfat	24,71	24,90 ccm
umgesetztes $\frac{n}{10}$ Brom	5,29	5,10 ccm

Zur Kjeldahlbestimmung wurden 10 ccm Urlösung mit Wasser auf 50 ccm gebracht und davon je 5 ccm verarbeitet, also 1 ccm Urlösung, deren Stickstoffgehalt 1. 7,05; 2. 7,10 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH entsprach.

Der Stickstoffgehalt ist für 15 ccm Urlösung im Mittel 7,075 · 15 ccm $\frac{n}{10}$ N-lösung.

Demnach sind die Quotienten: 1. 20,06; 2. 20,81.

7. Spaltungsmittel Schwefelsäure, 10 g konzentr. Schwefelsäure mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt.

Die Schwefelsäure wurde hergestellt durch Auffüllen von 50 g konz. Schwefelsäure mit Wasser auf 500 ccm. In dieser Säure wurden 25 g Gelatine gelöst zu 250 ccm Gesamtvolum.

Nach 10 stündigem Kochen am Rückflußkühler wurden je 15 ccm dieser Urlösung zur Brombestimmung verwendet unter Zusatz von Talkumpulver nach genauer Neutralisation mit Na OH.

50 ccm Bromidbromatlösung,	Titer 30,00	
zurücktitriert. Natriumthiosulfat	22,14	22,21 ccm
umgesetztes $\frac{n}{10}$ Brom	7,86	7,79 ccm

Zur Kjeldahlbestimmung wurden 10 ccm Urlösung mit Wasser auf 50 ccm gebracht, davon je 5 ccm verarbeitet, also 1 ccm Urlösung, deren Stickstoffgehalt 1. 10,70; 2. 10,50 ccm Na OH $\frac{n}{10}$ entsprach.

Der Stickstoffgehalt ist für 15 ccm Urlösung im Mittel 10,6 · 15 ccm $\frac{n}{10}$ N-lösung.

Demnach sind die Quotienten: 1. 20,23; 2. 20,41.

8. Spaltungsmittel Schwefelsäure, 25 g konz. Säure mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt.

Die Schwefelsäure wurde hergestellt durch Auffüllen von 62,5 g konz. Schwefelsäure mit Wasser auf 250 ccm. In dieser Säure wurden 20 g Gelatine gelöst zu 200 ccm Gesamtvolum. Nach dem Kochen (in der Kälte zeigte diese Lösung Neigung, weiße Kristallnadeln abzuscheiden, die sich bei Zimmertemperatur wieder lösten) wurden je 15 ccm dieser Lösung zur Brombestimmung verwendet, nach Neutralisieren mit Na OH und unter Zusatz von Talkumpulver.

50 ccm Bromidbromatlösung (Titer 30,00), zurücktitriert. Natriumthiosulfat 1. 22,92; 2. 22,83 ccm. Da sich sofort Nachbläuung zeigte, wurde nach 20 Minuten noch einmal Natriumthiosulfat zugesetzt, sodaß im ganzen die zum Zurücktitrieren verbrauchten ccm Na-thiosulfat 3. 23,07; 4. 22,93 ccm betrugen. Wenn man die beiden letzten Werte als maßgebend annimmt, sind die umgesetzten ccm Brom 3. 6,93; 4. 7,07; läßt man die beiden ersten gelten, sind die umgesetzten ccm Brom 1. 7,08; 2. 7,17.

Zur Kjeldahlbestimmung wurden 10 ccm Urlösung auf

50 ccm mit Wasser aufgefüllt und davon je 5 ccm verarbeitet, also 1 ccm Urlösung, deren Stickstoffgehalt 1. 9,5; 2. 9,4 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH entsprach.

Der Stickstoffgehalt ist für 15 ccm Urlösung im Mittel 9,45 · 15 ccm $\frac{n}{10}$ N-lösung.

Demnach sind die Quotienten für 1. 20,02; 2. 19,77; 3. 20,45 4. 20,05.

9. Spaltungsmittel Schwefelsäure, 50 g konz. Schwefelsäure mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt.

Die Säure wurde hergestellt durch Auffüllen von 125 g konz. Schwefelsäure mit Wasser auf 250 ccm. In dieser Säure wurden 50 g Gelatine gelöst zu 200 ccm Gesamtvolumen. Nach dem Kochen zeigte diese Lösung eine Abscheidung farbloser Kristallnadeln, deren Gewicht nach dem Abfiltrieren sich sehr gering zeigte. Von der filtrierten Lösung wurden je 15 ccm zur Brombestimmung verwendet genau wie bei 8.

50 ccm Bromidbromatlösung (Titer 30,00). Zurücktitriert. Natriumthiosulfat 20,6; 19,25 ccm. Da sich sofort und immer wiederkehrende Nachbläuung zeigte, wurde 20 Minuten stehen gelassen und nochmals zurücktitriert; die Farblosigkeit blieb jetzt bestehen.

Zurücktitriert. Natriumthiosulfat	22,44	22,70 ccm
umgesetztes Brom	7,56	7,30 ccm

Zur Kjeldahlbestimmung wurden 10 ccm Urlösung mit Wasser auf 50 ccm aufgefüllt und davon je 5 ccm verarbeitet, also je 1 ccm Urlösung, deren Stickstoffgehalt gleich 1. 9,6 2. 9,45 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH war.

Der Stickstoffgehalt ist für 15 ccm Urlösung im Mittel 9,52 · 15 ccm $\frac{n}{10}$ N-lösung.

Demnach sind die Quotienten: 1. 18,89 2. 19,56. Diese Quotienten sind wegen Unsicherheit des Punktes, der als Umschlag anzunehmen ist, wertlos.

10. Gelatine nach dem Spalten mit 25%iger Salzsäure länger als $^1/_4$ Stunde bromiert.

Herstellung der Urlösung:
200 g Gelatine wurden in 1 Liter 25%ige Salzsäure eingetragen, 10 Stunden am Rückflußkühler gekocht, filtriert, mit Wasser auf 3 Liter gebracht und von dieser Lösung je 10 ccm längerer Bromeinwirkung unterworfen.

Vor Zusetzen der Bromidbromatlösung wurde mit Natronlauge neutralisiert und Talkum zugesetzt, je 50 ccm Bromidbromatlösung (Titer 30,00) zugelassen und zurücktitriert wie üblich. Zur Kjeldahlbestimmung wurden 2 ccm verwendet.

Dauer der Bromeinwirkung in Stunden	Zurücktitrierte ccm Natriumthiosulfatlösung $\frac{n}{10}$	Dem umgesetzt. Brom entsprech. ccm $\frac{n}{10}$ Bromlösung für 10 ccm Urlösung	N-gehalt, ausgedrückt in ccm $\frac{n}{10}$ N-lösung für 2 ccm Urlösung	Quotient
22	23,90	6,10	14,90	12,23
44	22,95	7,05	14,95	10,59
96	21,84	8,16		9,14

In allen Fällen zeigte sich eine allmähliche, sehr lange wiederkehrende Nachbläuung, entsprechend den Beobachtungen bei längerer Bromierung der Aminosäuren (s. dort). Die Quotienten sind demnach nicht sicher.

Aus den Bestimmungen mit Gelatine (Zusammenstellung s. folgende Seite) geht hervor, daß die ungespaltene Gelatine einen größeren Bromverbrauch zeigt als die Lösung ihrer Spaltungsprodukte.

Zinnchlorürzusatz bei der Spaltung mit Salzsäure scheint in geringem Maße den Quotienten zu erhöhen, also das Bromumsetzungsvermögen zu vermindern (s. 3).

Längere Bromeinwirkung erhöht die Bromumsetzung, aber ein Teil des Broms zeigt sich nur locker gebunden, was mit den bei den Aminosäuren gemachten Beobachtungen übereinstimmt.

Zusammenstellung der Bestimmungen der Gelatinequotienten.

Die Konzentration der Gelatinelösung war stets 10 g Gelatine in 100 ccm Lösungsmittel. Davon wurden stets 15 ccm zur Brombestimmung verwendet und 1/4 Stunde bromiert.

Nr.	Lösungsmittel	Umgesetztes Brom in ccm $\frac{n}{10}$ Bromlösung	Menge der zur Kjeldahlbest. verarbeiteten Urlösung in ccm	Stickstoffgehalt der nach Kjeld. bestimmten Urlösung in ccm $\frac{n}{10}$ N-lösung	Quotienten
1	Wasser	9,00	1,00	15,50	15,84
		9,00	„	15,50	15,84
		8,90	„		16,01
		9,10	„		15,66
		8,95	„		15,92
		9,00	„		15,84
2	12,5 % ige HCl	7,46	2,00	20,05	20,18
		7,48	„	20,10	20,13
3	12,5% ige HCl + 1,5 % $SnCl_2$	6,92	1,00	10,10	21,84
		6,96	„	10,05	21,71
4	25 % ige HCl	8,20	1,00	10,70	19,94
		8,27	„	10,60	19,32
5	25 % ige HCl + 1,5 % $SnCl_2$	5,75	1,00	8,02	20,96
		6,00	„	8,05	20,09
6	25 % ige HCl + 3 % $SnCl_2$	5,29	1,00	7,05	20,06
		5,10	„	7,10	20,81
7	10 % ige H_2SO_4	7,86	1,00	10,70	20,23
		7,79	„	10,50	20,41
8	25 % ige H_2SO_4 schwache Nachbläuung	7,08	1,00	9,50	20,02
		7,17	„	9,40	19,77
		6,93	„	9,40	20,45
		7,07	„	9,40	20,05
9	50 % ige H_2SO_4 Starke Nachbläuung, daher sind die Quotienten unsicher.	7,56	1,00	9,60	18,89
		7,30	„	9,45	19,56

Gelatine mit 25 % iger HCl gespalten, Bromeinwirkung länger als 1/4 Stunde. Gelatine ca. 7,0 g in 100 ccm Lösung. 10 ccm wurden zur Brombestimmung verwendet.

Bromeinwirkungsdauer in Stunden					In allen Fällen
22	6,10	2,00	14,90	12,23	trat all-
44	7,05	„	14,95	10,59	mähliche
96	8,16	„		9,14	Nach-
					bläuung
					ein

b) Bestimmung der Quotienten der unter verschiedenen Bedingungen erhaltenen Spaltungsprodukte von Kasein.

Im Gegensatz zur Gelatine enthält Kasein Tyrosin, Tryptophan und Histidin. Deshalb war mit höherer Bromumsetzung zu rechnen.

Es sollte durch die folgenden Bestimmungen festgelegt werden, ob die Spaltungsprodukte durch Kochen mit 25%iger Salzsäure einen anderen Quotienten zeigen als die durch Kochen mit 25%iger Salzsäure und Zinnchlorür erhaltenen.

1. Kasein mit 25%iger Salzsäure gespalten.

20 g Kasein „Hammarsten und Merk" wurden in 100 ccm 25%iger Salzsäure gelöst, 10 Stunden am Rückflußkühler gekocht, die Lösung darauf mit Wasser auf 300 ccm gebracht und filtriert. Es ergab sich eine klare aber sehr dunkel gefärbte Flüssigkeit, in der der Umschlag bei der Titration sehr schwer zu erkennen war.

10 ccm dieser Lösung wurden nach Neutralisation der Säure mit Na OH bromiert.

50 ccm Bromidbromatlösung,	Titer 30,05	
zurücktitriert. Natriumthiosulfat	9,54	9,47 ccm
umgesetzte Bromlösung $\frac{n}{10}$	20,51	20,58 ccm

Zur Kjeldahlbestimmung wurden 20 ccm Urlösung mit Wasser auf 100 ccm gebracht und davon je 10 ccm verarbeitet, also 2 ccm Urlösung, deren Stickstoffgehalt 1. 13,45; 2. 13,2 ccm Na OH $\frac{n}{10}$ entsprach.

Der Stickstoffgehalt ist für 10 ccm Urlösung im Mittel 13,33 · 5 ccm $\frac{n}{10}$ N-lösung.

Demnach sind die Quotienten: 1. 3,25; 2. 3,24.

1. Kasein mit 25%iger Salzsäure und Zinnchlorür gespalten.

20 g Kasein, in 25%iger Salzsäure, die 4 g Zinnchlorür in 100 ccm gelöst enthielt, gelöst zu 100 ccm, wurden 10 Stunden

am Rückflußkühler gekocht, darauf mit Wasser auf 2 Liter gebracht und das Zinn mit Schwefelwasserstoff vollkommen ausgefällt. Die Fällung war schwarz. (Prüfung des noch stärker verdünnten Filtrates auf ungefälltes Zinn.) Die vom Niederschlag getrennte Lösung wurde auf dem Wasserbade zu Syrupdicke eingedampft, mit Wasser verdünnt, filtriert und das klare Filtrat auf 300 ccm gebracht. Die Lösung war bedeutend heller als die nicht mit Zinnchlorür behandelte.

Je 10 ccm dieser Urlösung wurden bromiert.

50 ccm Bromidbromatlösung,	Titer 29,98	
zurücktitriert. Natriumthiosulfat	13,02	13,26 ccm
umgesetzte Bromlösung $\frac{n}{10}$	16,96	16,72 ccm

Zur Kjeldahlbestimmung wurden 20 ccm Urlösung mit Wasser auf 100 ccm gebracht und davon 10 ccm verarbeitet, also 2 ccm Urlösung, deren Stickstoffgehalt 1. 8,40; 2. 8,5 ccm Na OH $\frac{n}{10}$ entsprach.

Der Stickstoffgehalt ist für 10 ccm Urlösung im Mittel 8,45 · 5 ccm $\frac{n}{10}$ N-Lösung.

Demnach sind die Quotienten: 1. 2,49; 2. 2,53.

3. Kasein nach seiner Spaltung mit 25%iger Salzsäure länger als $^1/_4$ Stunde bromiert.

Es wurde dieselbe Lösung verwendet wie bei 1 und ebenso verfahren.

10 ccm Urlösung. 50 ccm Bromidbromatlösung, (Titer 29,98).

Dauer der Bromeinwirkung in Stunden	Zurücktitrierte ccm Natriumthiosulfatlösung $\frac{n}{10}$	Dem umgesetzt. Brom entsprech. ccm $\frac{n}{10}$ Bromlösung für 10 ccm Urlösung	N-gehalt, ausgedrückt in ccm $\frac{n}{10}$ N-lösung für 2 ccm Urlösung	Quotient
20	2,81	27,17	13,45	2,44
42	1,35	28,63	13,20	2,32
4×24	0,94	29,04		2,29

In allen drei Fällen wurde durch das freie Brom eine geringe Fällung hervorgerufen. Nach Eintritt des Umschlages zeigte sich eine langsame, nicht allzu starke Nachbläuung.

4. Kasein nach seiner Spaltung mit 25%iger Salzsäure und Zinnchlorür länger als $^1/_4$ Stunde bromiert.

Es wurde dieselbe Lösung wie bei 2 verwendet und ebenso verfahren.

10 ccm Urlösung. 50 ccm Bromidbromatlösung, (Titer 29,80).

	Dauer der Bromeinwirkung in Stunden	Zurücktitrierte ccm $\frac{n}{10}$ Natriumthiosulfatlösung	Umgesetztes Brom, ausgedrückt in ccm $\frac{n}{10}$ Bromlösung	N-gehalt, ausgedrückt in ccm $\frac{n}{10}$ N-lösung für 2 ccm Urlösung	Quotient
a	20	2,64	27,34	8,40	1,54
b	42	1,40	28,58	8,50	1,48
c	4×24	0,65	29,36		1,44
d	6×24	0,50	29,48		1,43

Bei b, c und d trat durch die Bromeinwirkung eine dunkle aber geringe Fällung auf und starke Nachbläuung.

Zusammenstellung der Bestimmungen mit Kasein.

Die Konzentration der Kaseinlösung war ungefähr 0,7 g in 100 ccm Lösung, von der in jedem Falle 10 ccm bromiert, 2 ccm zur Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl verwendet wurden.

Dauer der Bromierung $^1/_4$ Stunde.

Lösungsmittel	Umgesetztes Brom, in ccm $\frac{n}{10}$Bromlösung ausgedrückt	Stickstoffgehalt der nach Kjeldahl bestimmten 2 ccm Urlösung, ausgedrückt in ccm $\frac{n}{10}$N-lösung	Quotienten
25%ige HCl	20,51	13,45	3,25
	20,58	13,20	3,24
25%ige HCl und 4 g Zinnchlorür gelöst in 100 ccm	16,96	8,40	2,49
	16,72	8,50	2,53

Dauer der Bromierung länger als $^1/_4$ Stunde.

Lösungsmittel	Umgesetztes Brom, in ccm $\frac{n}{10}$ Bromlösung ausgedrückt	Stickstoffgehalt der nach Kjeldahl bestimmten 2 ccm Urlösung, ausgedrückt in ccm $\frac{n}{10}$ N-lösung	Quotienten	Dauer der Bromeinwirkung in Stunden
25%ige HCl	27,17	13,45	2,44	20
	28,63	13,20	2,31	42
	29,04		2,28	4×24
25%ige HCl und 4 g Zinnchlorür gelöst in 100 ccm	27,34	8,40	1,54	20
	28,58	8,50	1,48	42
	29,36		1,44	4×24
	29,48		1,43	6×24

Auffallender Weise zeigt hier das mit Zinnchlorür gespaltene Kasein einen ziemlich höheren Bromverbrauch als das nur mit Salzsäure gespaltene, während bei der mit Salzsäure und Zinnchlorür zerlegten Gelatine das Gegenteil, wenn auch in sehr geringem Maße, der Fall war.

Bei längerer Bromierung fällt der Quotient entsprechend der Zeit, ein Teil des Broms ist locker gebunden; das mit Zinnchlorür behandelte Kasein zeigt entsprechend der Differenz der Quotienten bei viertelstündiger Bromierung niedrigere Quotienten als das nur mit Salzsäure gespaltene.

c) Bestimmung der Quotienten verschiedener Peptone und ihrer unter verschiedenen Bedingungen erhaltenen Spaltungsprodukte, ferner von Edestin.[1])

1. Pepton Witte,
   „ durch Pepsinverdauung von Blut,
   „ „ Pankreasverdauung von Gelatine. (Millon negativ),
   Trypsinfibrinpepton albumosefrei,
2. „ aus Blutfibrin (Millon negativ),
   Kyrinsulfat aus Fibrin,
3. Edestin.

[1]) Die verwendeten Peptone, mit Ausnahme des Witte-Peptons, sind mit Hilfe der Siegfriedschen Eisenmethode dargestellt worden.

Vor allen Brombestimmungen wurde das Spaltungsmittel neutralisiert. Salzsäure mit Na OH, Natronlauge mit HCl.

1. Pepton Witte. 10 g Pepton wurden in 12,5%iger Salzsäure zu 100 ccm gelöst. Von dieser klaren Lösung wurden je 5 ccm zur Brombestimmung, 2 ccm zur Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl verwendet.

Bromierung: 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,00		
zurücktitriert. Natriumthiosulfat	9,50	9,50 ccm
umgesetzte Bromlösung $\frac{n}{10}$	20,50	20,50 ccm

Kjeldahlbestimmung: In 2 ccm Lösung war der Stickstoffgehalt gleich 1. 17,2; 2. 16,90 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH. Der Stickstoffgehalt ist im Mittel für 5 ccm Urlösung 17,15 · 2,5 ccm $\frac{n}{10}$ N-lösung.

Demnach sind die Quotienten: 1. 2,09; 2. 2,09.

Der Rest obiger Lösung wurde 10 Stunden am Rückflußkühler gekocht und genau wie oben Brom- und Stickstoffbestimmungen ausgeführt.

Bromierung: 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,00		
zurücktitriert. Natriumthiosulfat	13,00	13,10 ccm
umgesetzte Bromlösung $\frac{n}{10}$	17,00	16,90 ccm

Kjeldahlbestimmung: In 2 ccm Lösung war der Stickstoffgehalt gleich 1. 20,20; 2. 20,20 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH. Der Stickstoffgehalt ist im Mittel für 5 ccm Urlösung 20,2 · 2,5 ccm $\frac{n}{10}$ N-lösung.

Demnach sind die Quotienten: 1. 2,97; 2. 2,99.

Pepton durch Pepsinverdauung von Blut hergestellt.

5 g wurden 2 Tage bei 100° C getrocknet, um die letzten Spuren Alkohol und Essigsäure zu entfernen, und darauf in 12,5%iger HCl zu 50 ccm gelöst. Je 5 ccm wurden bromiert, 2 ccm der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl unterworfen.

Brombestimmung: 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 29,60		
zurücktitriert. Natriumthiosulfat	12,30	12,45 ccm
umgesetzte $\frac{n}{10}$ Bromlösung	17,30	17,15 ccm

Kjeldahlbestimmung: In 2 ccm Lösung war der Stickstoffgehalt gleich 1. 18,80; 2. 18,70 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Der Stickstoffgehalt für 5 ccm Lösung ist im Mittel 18,75 · 2,5 ccm $\frac{n}{10}$ N-lösung.

Demnach sind die Quotienten: 1. 2,71; 2. 2,73.

Der Rest obiger Lösung wurde 10 Stunden am Rückflußkühler gekocht und, genau wie oben vor dem Kochen, Brom- und Stickstoffbestimmungen ausgeführt.

Brombestimmung: 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 29,60

zurücktitriert Natriumthiosulfat $\frac{n}{10}$	19,20	19,20 ccm
umgesetzte Bromlösung $\frac{n}{10}$	10,40	10,40 ccm

Kjeldahlbestimmung: In 2 ccm Lösung war der Stickstoffgehalt gleich 1. 18,95; 2. 19,00 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Der Stickstoffgehalt für 5 ccm Lösung ist im Mittel 18,975 · 2,5 ccm $\frac{n}{10}$ N-lösung.

Demnach sind die Quotienten: 1. 4,56; 2. 4,56.

Pepton durch Pankreasverdauung von Gelatine, mit Hilfe der Siegfriedschen Eisenmethode dargestellt.

(Keine Millon-Reaktion.)

5 g wurden in 12,5%iger HCl zu 50 ccm gelöst, je 5 ccm dieser Lösung bromiert, 2 ccm der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl unterworfen. Da bei Jodkaliumzusatz Klumpenbildung eintrat, mußte Talkumpulver bei der Bromierung zugesetzt werden.

Brombestimmung: 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,00

zurücktitriert. Natriumsulfat	26,35	26,40 ccm
umgesetztes Brom $\frac{n}{10}$	3,65	3,60 ccm

Kjeldahlbestimmung: In 2 ccm Lösung war der Stickstoffgehalt gleich 1. 18,65; 2. 18,45 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Der Stickstoffgehalt für 5 ccm Lösung ist im Mittel 18;55 · 2,5 ccm $\frac{n}{10}$ N-lösung.

Demnach sind die Quotienten: 1. 12,71; 2. 12,88.

Der Rest obiger Lösung wurde 10 Stunden am Rückflußkühler gekocht und wie oben vor dem Kochen Brom- und Kjeldahlbestimmungen ausgeführt.

Brombestimmung: 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,00

zurücktitriert. Natriumthiosulfat	27,10	27,10 ccm
umgesetztes Brom $\frac{n}{10}$	2,90	2,90 ccm

Kjeldahlbestimmung: In 2 ccm Lösung war der N-gehalt gleich 1. 21,05; 2. 20,95 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Der Stickstoffgehalt für 5 ccm Urlösung ist im Mittel 21,00 · 2,5 ccm $\frac{n}{10}$ N-lösung.

Demnach sind die Quotienten: 1. 18,10; 2. 18,10.

Trypsinfibrinpepton durch Pankreasverdauung von Fibrin dargestellt.

5 g trockenes Trypsinfibrinpepton wurden in kaltem Wasser zu 50 ccm gelöst, von dieser Lösung unter Talkumpulverzusatz (da ohne dieses Klumpenbildung auf Jodkaliumzusatz eintrat) je 5 ccm bromiert; 5 ccm Urlösung wurden zur Kjeldahlbestimmung auf 50 ccm gebracht und davon je 5 ccm verarbeitet, also 0,5 ccm Urlösung.

Brombestimmung: 1. und 2. Bestimmung klumpten.

50 ccm Bromidbromatlösung,	Titer 30,00	
zurücktitriert. Natriumthiosulfat	27,25	27,30 ccm
umgesetzte $\frac{n}{10}$ Bromlösung	2,75	2,70 ccm

Kjeldahlbestimmung: In 0,5 ccm Urlösung war der Stickstoffgehalt gleich 1. 5,85; 2. 5,90 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Der Stickstoffgehalt für 5 ccm Urlösung ist im Mittel 5,875 · 10 ccm $\frac{n}{10}$ N-lösung.

Demnach sind die Quotienten: 1. 21,36; 2. 21,76.

Der Rest obiger Lösung (25 ccm) wurde mit 25%iger Salzsäure auf 50 ccm gebracht, 10 Stunden am Rückfluß-

kühler gekocht und wie vor dem Kochen Brom- und Kjeldahlbestimmungen ausgeführt. Zur Brombestimmung wurden je 10 ccm Urlösung, zur Kjeldahlbestimmung 10 ccm auf 50 ccm aufgefüllt und davon je 5 ccm verarbeitet, also 1 ccm Urlösung.

Brombestimmung: 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,00		
zurücktitriert. Natriumthiosulfat	27,69	27,70 ccm
umgesetzte $\frac{n}{10}$ Bromlösung	2,31	2,30 ccm

Kjeldahlbestimmung: In 1 ccm Urlösung war der Stickstoffgehalt gleich 1. 5,7; 2. 5,80 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Der Stickstoffgehalt für 5 ccm Urlösung ist im Mittel 5,75 · 10 ccm $\frac{n}{10}$ N-lösung.

Demnach sind die Quotienten: 1. 24,9; 2. 25,00.

2. Trypsinpepton, dargestellt aus Blutfibrin aus Eisenniederschlag I (Millon negativ).

5 g des Präparates wurden nach dem Trocknen in 12,5%iger H Cl zu 50 ccm gelöst und je 5 ccm der Lösung bromiert, 2 ccm der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl unterworfen.

Brombestimmung: 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,00		
zurücktitriert. Natriumthiosulfat	11,60	11,60 ccm
umgesetzte $\frac{n}{10}$ Bromlösung	18,40	18,40 ccm

Kjeldahlbestimmung: In 2 ccm Urlösung war der Stickstoffgehalt gleich 1. 21,80; 2. 21,70 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Der Stickstoffgehalt für 5 ccm Lösung ist im Mittel 21,75 · 2,5 ccm $\frac{n}{10}$ N-lösung.

Demnach sind die Quotienten: 1. 2,96; 2. 2,96.

Der Rest obiger Lösung wurde 10 Stunden am Rückflußkühler gekocht und wie vor dem Kochen Brom- und N-Bestimmungen ausgeführt.

Brombestimmung: 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,00

zurücktitriert. Natriumthiosulfat	14,95	14,71 ccm
umgesetztes $\frac{n}{10}$ Brom	15,05	15,29 ccm

Kjeldahlbestimmung: In 2 ccm Urlösung war der Stickstoffgehalt gleich 1. 21,70; 2. 21,70 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Der Stickstoffgehalt für 5 ccm Urlösung ist im Mittel 21,7 · 2,5 ccm $\frac{n}{10}$ N-lösung.

Demnach sind die Quotienten: 1. 3,60; 2. 3,59.

Kyrinsulfat aus Fibrin dargestellt, 6 mal umgefällt.

5 g, in wässriger Lösung zur Entfernung des Alkoholgehaltes nochmals im Vakuum eingeengt, wurden mit Wasser auf 50 ccm gebracht, je 5 ccm davon bromiert, 5 ccm zur Kjeldahlbestimmung auf 50 ccm verdünnt und davon je 5 ccm verarbeitet, also 0,5 ccm Urlösung.

Brombestimmung: 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,00

zurücktitriert. Natriumthiosulfat	11,85	12,15 ccm
umgesetzte $\frac{n}{10}$ Bromlösung	18,15	17,85 ccm

Kjeldahlbestimmung: In 0,5 ccm Urlösung war der Stickstoffgehalt gleich 1. 5,30; 2. 5,22 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Der Stickstoffgehalt für 5 ccm Urlösung ist im Mittel 5,26 · 10 ccm $\frac{n}{10}$ N-lösung.

Demnach sind die Quotienten: 1. 2,90; 2. 2,95.

Zum Reste der obigen Lösung (35 ccm) wurden 3,5 g konz. Schwefelsäure gegeben und nach 10stündigem Kochen am Rückflußkühler wie vor dem Kochen bromiert und kjeldahlisiert. Zur Kjeldahlbestimmung wurden 10 ccm auf 50 ccm verdünnt und davon je 5 ccm verarbeitet, also 1 ccm Urlösung.

Brombestimmung: 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,00

zurücktitriert. Natriumthiosulfat	14,05	14,05 ccm
umgesetztes Brom $\frac{n}{10}$	15,95	15,95 ccm

Kjeldahlbestimmung: In 1 ccm Urlösung war der Stickstoffgehalt gleich 1. 9,65; 2. 9,45 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Der Stickstoffgehalt für 5 ccm Urlösung ist im Mittel 9,55 · 5 ccm $\frac{n}{10}$ N-lösung.

Demnach sind die Quotienten: 1. 2,99; 2. 2,99.

Zusammenstellung der Bestimmungen mit Peptonen vor und nach der Spaltung durch 10stündiges Kochen mit 12,5%iger Salzsäure, mit Kyrinsulfat gespalten durch Schwefelsäure.

	Quotienten	
	vor der Spaltung	nach der Spaltung
Pepton Witte	2,09	2,97
	2,09	2,99
Pepton aus Pepsinverdauung von Blut	2,71	4,56
	2,73	4,56
Pepton aus Pankreasverdauung von Gelatine	12,71	18,10
	12,88	18,10
Trypsinfibrinpepton	21,36	24,90
	21,76	25,00
Trypsinfibrinpepton aus Blutfibrin	2,96	3,60
	2,96	3,59
Kyrinsulfat	2,90	2,99
	2,95	2,99

Die von der Gelatine stammenden Peptone ergeben bedeutend höhere Quotienten als die Peptone anderer Herkunft. Die Quotienten der Gelatinepeptone sind fast gleich denen der Gelatine.

Alle Peptone besitzen ebenso wie die Gelatine die Eigenschaft, mehr Brom zu binden als die Summe ihrer Spaltungsprodukte.

Nachdem durch die Säurespaltung die wahrscheinliche obere Grenze des Quotienten bestimmt worden war, wurde in den folgenden Versuchen das der allmählichen Spaltung vermutlich proportionale Steigen des Quotienten zu verfolgen gesucht.

Bestimmung der Quotienten von Witte-Pepton während allmählicher Spaltung durch 1. 12,5%ige Salzsäure, 2. dieser äquivalenter Natronlauge, 3. Pepsin.

1. 20 g Pepton wurden gelöst in 200 ccm 0,4%iger Salzsäure, die 0,5 g Pepsin gelöst enthielt,
2. 20 g Pepton wurden gelöst in 200 ccm 12,5%iger Salzsäure,
3. 20 g Pepton wurden gelöst in 200 ccm der 12,5%igen Salzsäure äquivalenter Natronlauge.

Diese klaren Lösungen wurden in Glasstöpselflaschen von 500 ccm Inhalt gebracht und, nachdem von jeder Lösung 2 Brombestimmungen und 2 Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl gemacht worden waren, im Brutschrank bei 40° C gehalten. Die Lösung von Pepton in Na OH roch stark nach NH_3.

Kjeldahlbestimmungen: Es wurden je 2 ccm der Lösungen verarbeitet.

Dem N-gehalt von 2 ccm Lösung entsprechende ccm $\frac{n}{10}$ N-lösung	1. 17,12 2. 17,30 3. 16,70

Der Stickstoffgehalt für 5 ccm Lösung ist demnach:

1. gleich 17,12 · 2,5 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH
2. „ 17,30 · 2,5 „ „ „
3. „ 16,70 · 2,5 „ „ „

Diese Produkte sind durch den bei jeder folgenden Bestimmung ermittelten Bromverbrauch zur Berechnung der Quotienten zu dividieren. 5 ccm Lösung wurden jedesmal verarbeitet, 50 ccm Bromidbromatlösung (Titer 30,00) angewendet.

Die Zahl der Stunden, nach denen Brombestimmungen vorgenommen wurden.	I. Spaltung durch Pepsinsalzsäure			II. Spaltung durch 12,5%ige Salzsäure			III. Spaltung durch Natronlauge		
	Zurücktitrierte ccm $\frac{n}{10}$ $Na_2S_2O_3$	Umgesetztes Brom in ccm $\frac{n}{10}$ Bromlösung	Quotient	Zurücktitrierte ccm $\frac{n}{10}$ $Na_2S_2O_3$	Umgesetztes Brom in ccm $\frac{n}{10}$ Bromlösung	Quotient	Zurücktitrierte ccm $\frac{n}{10}$ $Na_2S_2O_3$	Umgesetztes Brom in ccm $\frac{n}{10}$ Bromlösung	Quotient
0	10,45	19,55	2,19	10,70	19,30	2,24	10,15	19,85	2,10
1×24	10,30	19,70	2,17	10,00	20,00	2,16	10,45	19,55	2,14
4×24	10,64	19,36	2,20	11,00	19,00	2,27	11,28	18,72	2,23
6×24	10,70	19,30	2,22	10,90	19,10	2,26	12,10	17,90	2,33
8×24	10,50	19,50	2,19	11,40	18,60	2,33	12,40	17,60	2,37
10×24	10,40	19,60	2,18				13,05	16,95	2,46
14×24	10,70	19,30	2,22	12,00	18,00	2,38	12,70	17,30	2,41
16×24	Lösung begann zu faulen			12,20 12,30	17,80 17,70	2,43	13,35 12,95	16,65 17,05	2,47
23×24				12,60 12,60	17,40 17,40	2,48	13,50 13,65	16,50 16,35	2,53
33×24				13,90 13,40	16,10 16,60	2,64			
42×24				16,22 16,22	13,78 13,70	3,13			
68×24				14,35 14,00	15,65 16,00	2,73	14,10 13,85	15,90 16,15	2,67

Pepton aus Blut durch Pepsinverdauung gewonnen. Bestimmung der Quotienten während der allmählichen Spaltung durch 12,5%ige Salzsäure bei 40°.

Es wurde dasselbe Pepton verarbeitet wie bei der schnellen Spaltung durch Salzsäure, bei 100° getrocknet und 20 g in 200 ccm 12,5%iger Salzsäure gelöst, 5 ccm sofort der Brombestimmung und 2 ccm der Stickstoff- und Kjeldahlbestimmung unterworfen. Es wurde dann bei 40° gespalten.

Kjeldahlbestimmung: In 2 ccm Lösung war der Stickstoffgehalt gleich 1. 19,15; 2. 19,25 ccm $\frac{n}{10}$ NaOH.

Der Stickstoffgehalt für 5 ccm Lösung ist im Mittel 19,05 · 2,5 ccm $\frac{n}{10}$ N-lösung.

Brombestimmung: 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,00.

Dauer der Spaltung in Stunden, nach denen die Brombestimmung vorgenommen wurde	Zurücktitrierte ccm $\frac{n}{10}$ $Na_2S_2O_3$	Dem umgesetzten Brom entsprechende ccm $\frac{n}{10}$ Bromlösung	Quotient
0	12,10 12,20	17,85	2,67
2×24	14,06 13,72	16,11	2,96
12×24	15,84 16,28	13,94	3,42
38×24	18,50 18,00	11,75	4,05

3. Edestin von Gehe bezogen.

Bestimmung der Quotienten während der allmählichen Spaltung mit 12,5%iger Salzsäure bei 40°C.

10 g Edestin wurden in 1000 ccm 0,5%iger Natriumkarbonatlösung gelöst und filtriert (klare opaleszierende Lösung), 0,5 g Trypsin in 50 ccm 0,5%iger Natriumkarbonatlösung gelöst, beide Lösungen für sich auf 40° gebracht, einige Tropfen Chloroform zur Edestinlösung gegeben, beide Lösungen

gemischt und sofort 20 ccm zur Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl, 50 ccm zur Brombestimmung verwendet, sodaß Trypsin noch keine Änderungen der Lösung verursacht haben konnte. Wie ich vorher feststellte, zeigt Chloroform ein so geringes Brombindungsvermögen, daß ein dadurch verursachter kleiner Fehler übersehen werden kann.

Kjeldahlbestimmung: In 20 ccm Lösung war der Stickstoffgehalt gleich 1. 21,4; 2. 21,1 ccm $\frac{n}{10}$ Na OH.

Der Stickstoffgehalt für 50 ccm Lösung entspricht im Mittel 2,5 · 21,25 ccm $\frac{n}{10}$ N-Lösung.

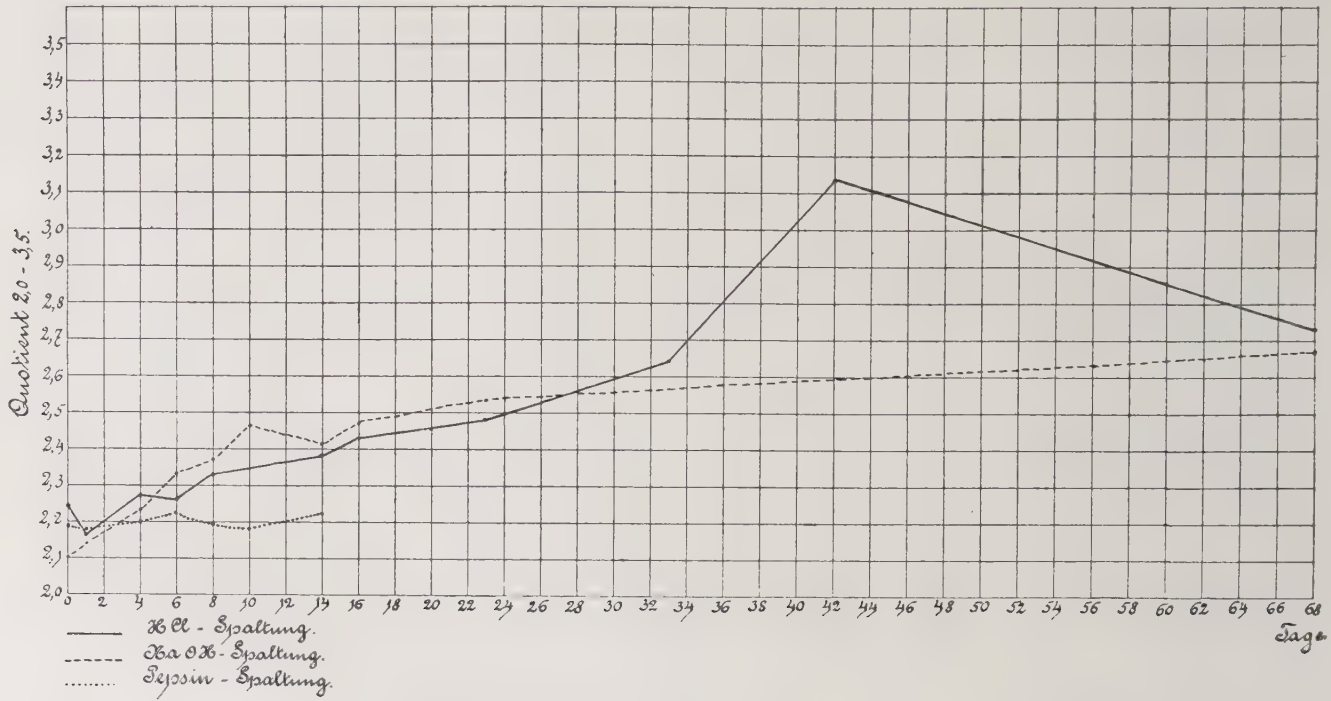
Brombestimmung: 50 ccm Bromidbromatlösung, Titer 30,00.

Dauer der Spaltung in Stunden, nach denen die Brombestimmung vorgenommen wurde	Zurücktitrierte ccm $\frac{n}{10}$ $N_2S_2O_3$-lösung	Umgesetztes Brom in ccm $\frac{n}{10}$ Bromlösung	Quotient
0	13,59 13,49	16,46	3,20
0,5	14,25 14,25	15,75	3,37
24	15,19 15,10	14,85	3,58
2×24	15,10 15,18	14,86	3,57
4×24	15,50 15,48	14,51	3,66
35×24	16,00 16,00	14,00	3,70

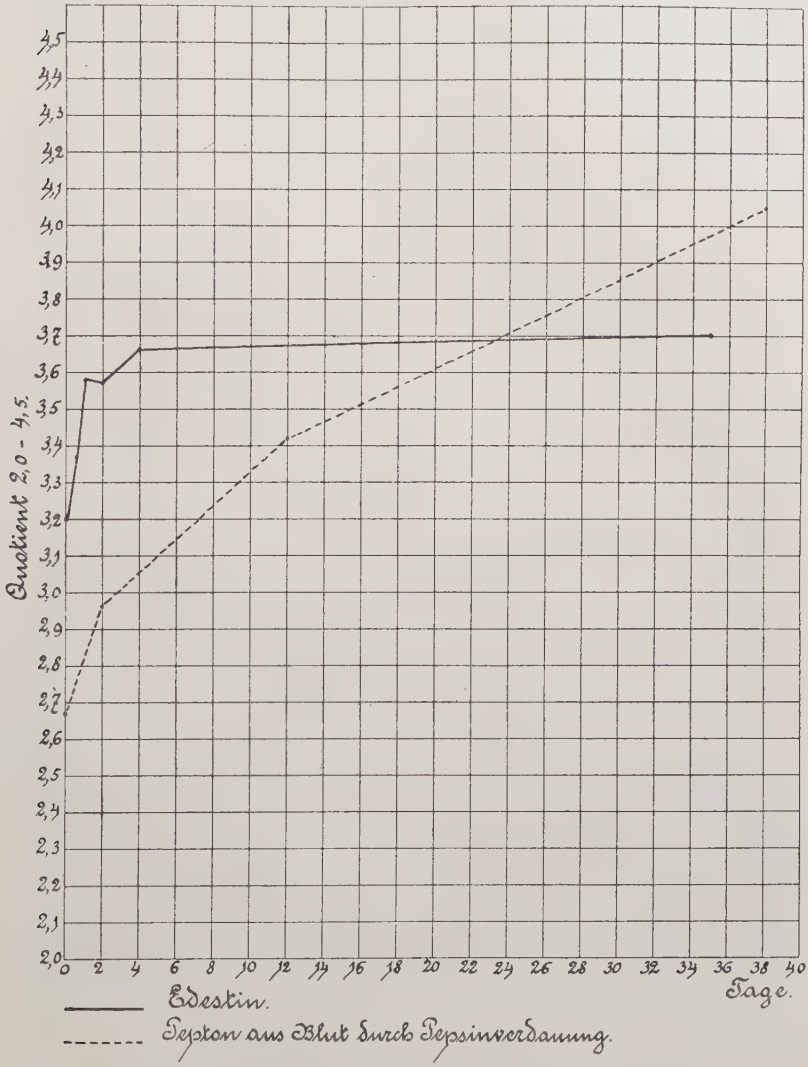
Bei dem letzten Versuch schien die Lösung verdorben zu sein und wurde deshalb weggeworfen.

Die graphische Darstellung der Bestimmungen der Quotienten im Laufe allmählicher Spaltung von Pepton Witte, Pepton aus Blut durch Pepsinverdauung und Edestin s. Seite 80 und 81.

Entsprechend dem allmählichen Abbau des Eiweißmoleküls tritt ein proportionales Steigen des Quotienten ein. Die Endquotienten der Produkte der allmählichen Spaltung sind bei


Quotient 2,0 - 3,5
3,5
3,4
3,3
3,2
3,1
3,0
2,9
2,8
2,7
2,6
2,5
2,4
2,3
2,2
2,1
2,0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46 48 50 52 54 56 58 60 62 64 66 68
Tage
HCl - Spaltung.
NaOH - Spaltung.
Pepsin - Spaltung.

Pepton Witte und Pepton aus Blut durch Pepsinverdauung gegen die bei schneller Spaltung durch Kochen erhaltenen etwas niedriger s. a. S. 75.



Bei der Pepsinzersetzung erfolgt sehr langsamer Abbau analog einem sehr langsamen Steigen des Quotienten.

Die Spaltungen durch Salzsäure und Natronlauge gehen ziemlich parallel; beim 32. bis 42. Tag zeigt die Salzsäurespaltung Zunahme in der Schnelligkeit der Spaltung. Von da ab fällt der Quotient wieder sehr langsam. — Bei Pepton aus Blut weist die Kurve auf einen anfangs etwas schnelleren Abbau hin, der dann allmählich langsamer vor sich geht.

Auffallend ist bei Edestin das besonders schnelle Aufsteigen des Quotienten in der ersten $^1/_2$ Stunde und am 1. Tage. Dann bleibt die Kurve fast auf gleicher Höhe.

Es scheint das Molekul schnell gespalten zu werden. Das schnelle Nachlassen der Brombindungsfähigkeit anfangs wird noch auffallender aus folgendem Grunde.

Es ist bekannt, daß Tyrosin in gebundener Form, wie im Eiweiß, der Bromierung nicht zugänglich ist. Darauf gründen sich z. B. die Arbeiten von James H. Millard[1]) und Edmund Theodore Millard and Adrian John Brown[2]), die den Verlauf proteolytischer Veränderung in solchen Fällen durch Bromierung zu ermitteln suchen, in denen bei Abbau des Eiweißmoleküls Tyrosin abgespalten wird. Bei Verdauung von Edestin wird nach diesen Autoren durch Pankreasextrakt in 0,5%iger Natriumkarbonatlösung binnen einer Stunde sämtliches Tyrosin abgespalten, was von Samuel James Manson and Thomas Duncan, Mosscrop B. Sc.[3]) bestätigt wird.

Durch diese Abspaltung müßte sich also auch in meinen Versuchen eine höhere Bromumsetzung zeigen; da das Gegenteil eintrat, so wäre nur die Erklärung möglich, daß die Fähigkeit der untersuchten Lösung, Brom umzusetzen, zwar stieg durch Abspaltung substitutionsfähigen Tyrosins, aber trotzdem fiel durch eine umso mehr überwiegende Abnahme der Bromumsetzungsfähigkeit der durch Trypsin gebildeten Spaltstücke des Edestinmoleküls.

[1]) Trans. guinness. researche Laboratory 1903, 1. part. I.
[2]) J. Lond. Chem. Soc. **89**, 145 (1906).
[3]) J. Lond. Chem. Soc. **103/104**, 281 (1913).

Nun zeigt aber Edestin, nach der Methode der englischen Autoren behandelt, nach 24, 72 und 144 Stunden dauernder Verdauung nach 24 Stunden ein dem Tyrosingehalt entsprechendes Steigen der Bromumsetzung, die nach 72 und 144 Stunden dieselbe bleibt. Nach dem hier angewandten Verfahren nach Koppeschaar fällt von Anfang an die Bromumsetzungsfähigkeit. Der Grund dieses Unterschiedes kann demnach nur in der Art der Bromierung zu suchen sein.

IV. Methode der Tyrosinbestimmung von Brown und Millard.

Brown und Millard verfuhren wie folgt: Eine 1%ige Lösung von Edestin wurde durch Lösen von 2 g trockener Substanz in 200 ccm 0,5%iger Natriumkarbonatlösung hergestellt. Je 50 ccm dieser Lösung wurden in vier Flaschen gebracht, zu drei dieser Flaschen je 5,0 ccm aktiver Pankreasextrakt Benger zugefügt, zu der vierten, als Kontrolle, ebenfalls 5 ccm, der vorher durch Erhitzen auf 100° inaktiv gemacht worden war. Alle 4 Flaschen wurden bei 32° gehalten, nach 24 Stunden die Kontrollflasche und eine mit aktivem Extrakt beschickte titriert, in der schon angegebenen Zeit die übrigen.

Die Titrationen wurden folgendermaßen ausgeführt.

In jede Flasche wurden 20 ccm 20%ige Salzsäure und 10 ccm einer 20%igen Kaliumbromidlösung gegeben und zu dieser Mischung $\frac{n}{5}$ Kaliumbromatlösung zutitriert bis zu einige Minuten bleibendem Bromüberschuß, ermittelt durch Tüpfeln mit Jodkaliumstärkelösung.

Resultate.

	Zeit der Verdauung in Stunden	Zutitrierte Bromatlösung	Zutitrierte Bromatlösung nach Abzug der Kontrolle	Danach ausgerechnetes Tyrosin
Wirksame Verdauung	24	0,80	0,38	4,06
„ „	72	0,80	0,38	4,06
„ „	144	0,80	0,38	4,06
Unwirksame „	24	0,42	—	—

James Manson Auld und Thomas Duncan bestätigen die Richtigkeit der Analysen dieser Methode, erwähnen aber, sie sei schwer zu bewerkstelligen und verbessern sie, indem sie als Indikator Methylviolett anwenden und mit $\frac{n}{20}$ Bromatlösung zurücktitrieren. Die von Millard verwendete $\frac{n}{5}$ Bromatlösung ist 12 mal so stark als die von mir gebrauchte.

Ich titrierte in völlig analoger Weise nach Millard und wich nur durch folgende Änderung ab bei Herstellung der Lösung.

Ich löste 3 g Edestin in 300 ccm 0,5%iger Natriumkarbonatlösung, filtrierte, erwärmte auf 40° C. und fügte eine Lösung von 0,15 g Trypsin in ganz wenig Wasser zu. 50 ccm wurden sofort titriert.

Titration: 1. 0,59 ccm; 2. 0,50 ccm.

Titration nach einer Stunde: 1. 0,75 ccm; 2. 0,73 ccm.

Es trat also Steigen des Bromverbrauches ein.

Pepton Witte titrierte ich sowohl nach Millard als nach Koppeschaar vor und nach Spaltung durch 10stündiges Kochen mit 12,5%iger Salzsäure.

5 g Witte-Pepton wurden in 50 ccm 12,5%iger Salzsäure gelöst und sofort je 5 ccm 1. nach der Koppeschaarschen Methode bromiert und 2. nach Millard.

1. 50 ccm Bromidbromatlösung,	Titer 30,00		
zurücktitriert. Natriumthiosulfat	9,45	9,40	ccm
umgesetztes Brom $\frac{n}{10}$	20,55	20,60	ccm
2. zutitrierte Bromatlösung $\frac{n}{5}$	1,22	1,23	ccm

nach 10 Stunden Kochen am Rückflußkühler wurden die Bestimmungen wiederholt.

1. 50 ccm Bromidbromatlösung,	Titer 30,00		
zurücktitriert. Natriumthiosulfat	12,90	12,75	ccm
umgesetzte Bromlösung $\frac{n}{10}$	17,10	17,25	ccm
2. zutitrierte Bromatlösung $\frac{n}{5}$	1,04	1,01	ccm

Bei der schwierigen Ausführung der Millardschen Methode (Tüpfeln) und der Stärke seiner Bromatlösung ist das Sinken der Bromumsetzung, hervorgehend aus dem nur um 0,2 ccm abnehmenden Bromatlösungsverbrauch von zweifelhafter Sicherheit aber doch analog den Bestimmungen der Koppeschaarschen Methode. Die Koppeschaarsche Methode gibt höheren Bromverbrauch, wahrscheinlich weil Brom in großem Überschuß einwirkt. Darauf schien mir der Unterschied der beiden Methoden in ihrer Wirkung auf Edestin bei langsamer Spaltung zurückzuführen zu sein.

Daß die durch das Trypsin abgespaltenen Bruchstücke im Gegensatz zu dem frei gewordenen Tyrosin das starke Steigen des Quotienten verursachen, kann nach den Resultaten von Millard nicht möglich sein.

Möglich wäre es dagegen, daß von Anfang an das vom Trypsin nicht angegriffene Edestinmolekül durch den starken Bromüberschuß gespalten wird, neben dem Tyrosin in noch andere Spaltstücke, daß dadurch der höhere Bromverbrauch nach der Koppeschaarschen Methode verursacht wird und deshalb, weil von Anfang an in Lösungen gearbeitet wird, die alles Tyrosin abgespalten enthalten, die weitere Spaltung durch Trypsin im Steigen des Quotienten sich zeigen kann.

Um zu versuchen ob Tyrosin durch Brom abgespalten wird, stellte ich folgende Versuche mit Kasein an.

Einwirkung von Brom auf Kasein und Prüfung auf abgespaltenes Tyrosin.

50 g Kasein Hammarsten und Merk wurden mit 1 Liter Wasser zu einem homogenen Brei angerieben, in eine Saugflasche gebracht und durch eine bis auf den Flaschenboden reichende Röhre mit angesaugten Bromdämpfen solange geschüttelt, bis nach 24 stündigem Stehen die gelbe Bromfarbe bestehen blieb. Das Brom befand sich mit Wasser überschichtet in einem kleinen Fläschchen, das mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen verschlossen war, durch dessen eine Bohrung das Luftzuführungsrohr bis auf den Boden reichte, durch dessen andere Bohrung das mit dem langen

Glasrohr der Saugflasche verbundene kurze Absaugrohr führte. Die Bromierung ging ohne Schwierigkeit vor sich. Nach Mörner[1]) wird Dibromtyrosin in 0,3 % Lösung durch Phosphorwolframsäure nicht gefällt, ist bei Kochen mit Salzsäure beständig und kann durch Kochen mit Zinkstaub quantitativ debromiert werden. Es wurde filtriert, das Brom durch Luft verjagt, das klare Filtrat mit durch Äther gereinigter 5 prozentiger PWS-Schwefelsäure im Überschuß gefällt, die PWS mit Barythydrat und das Barythydrat mit Schwefelsäure quantitativ gefällt. Das klare Filtrat gab auf dem Wasserbade zur Beseitigung der Bromwasserstoffsäure zur Trockne eingedampft eine braune, zähe kristallinische Masse. Diese wurde mit Zinkstaub durch 6 stündiges Kochen debromiert, die heiße Flüssigkeit zur Fällung etwa gelösten Zinks mit ein wenig gebrannter Magnesia versetzt, filtriert und das Filtrat auf dem Wasserbade eingeengt; der letzte Rest der Flüssigkeit über Schwefelsäure verdunstet gab einen bräunlichen Rückstand, der in Wasser gelöst und mit Millons Reagens geprüft Tyrosinreaktion nicht gab; auf Zusatz von Merkurinitrat trat starke Fällung ein.

Ein zweiter Versuch wurde mit 100 g Kasein in vollkommen analoger Weise angestellt. 100 g Kasein wurden mit 1800 ccm Wasser zu einem Brei angerieben, 200 ccm konzentrierte Salzsäure zugesetzt und bromiert wie bei dem ersten Versuch. Die Debromierung wurde mit 2 g Zinkstaub durch 10 stündiges Kochen ausgeführt. Der dadurch gewonnene Rückstand gab mit Merkurinitrat eine starke Fällung, die sich im Überschuß löste, aber keine Tyrosinreaktion mit Millons Reagens.

Wenn nun auch aus diesen beiden Versuchen sich Tyrosinabspaltung durch Brom im Überschuß in salzsaurer Lösung nicht nachweisen ließ, zeigte sich doch, daß überschüssiges Brom spaltend auf Kasein wirkt. Daraus erklärt sich der höhere Bromverbrauch bei der von mir angewendeten Methode gegenüber der von Brown und Millard.

[1]) Z. physiol. Chem. **88**, 124 (1913).

Die Ergebnisse der Untersuchungen.

1. Es wurde eine Methode der Anwendung der Koppeschaarschen Reaktion auf Proteinkörper und deren Spaltungsprodukte ausgearbeitet.

2. Die Anwendung der Methode auf Aminosäuren und Eiweißkörper führte zu der Aufstellung des Quotienten $\frac{N}{Br}$.

3. Für die untersuchten Aminosäuren ergab sich der Quotient gleich ∞; ausgenommen sind Tyrosin, Tryptophan und Histidin.

4. Bei den unter den verschiedensten Bedingungen durchgeführten Spaltungen von Eiweißkörpern und Peptonen wurde der Quotient der Summe der Spaltungsprodukte stets größer gefunden als bei den nicht gespaltenen Eiweißkörpern und Peptonen.

5. Es wurde der Quotient in den verschiedenen Stadien der allmählichen Spaltung von Proteinsubstanzen ermittelt.

Vita.

Ich, Heinrich Reppin, geboren am 16. März 1884 zu Leipzig, evang. Konfession, besuchte nach erhaltenem Elementarunterricht die Nikolaischule zu Leipzig, trat nach bestandener Reifeprüfung in die pharmazeutische Lehre ein, legte nach zuvor bestandener pharmazeutischer Vorprüfung das chemische Verbandsexamen ab, unterzog mich sodann dem pharmazeutischen Staatsexamen und erlangte hierauf die Approbation als Apotheker.

Immatrikuliert war ich ausschließlich an der Universität zu Leipzig, woselbst ich die Praktika bezw. Vorlesungen folgender Herren Professoren und Dozenten besuchte: Beck, Beckmann, Biermann, Boehm, Correns, Deussen, Doren, Eulenburg, Heller, Paal, Pfeffer, Schulz, Siegfried, Wagner, Weule, Wiener, Windscheid, Wittkowski.